

IAP5 Rec'd PCT/PTO 30 AUG 2006

## 明 細 書

血糖値の低下に供される医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、血糖値を低下せしめ、糖尿病の予防または治療に供される医薬組成物に関する。

また、本発明は、摂食障害を治療するための医薬組成物に関する。

さらにまた、本発明は、合理的なダイエットに用いられる栄養補助組成物に関する。

背景技術

[0002] 現代社会において、糖尿病患者数の増加は著しく、その治療のために必要とされる社会的、経済的コストは莫大な金額にのぼり、医療分野における重大問題として、早期解決が望まれている。

[0003] 糖尿病は、血液中に存在するグルコースを正常に代謝することができず、いわゆる高血糖状態を持続させ、身体機能に様々な悪影響を及ぼすものである。糖尿病の主な合併症として、網膜症、腎症、神経障害、動脈硬化などが挙げられるが、これらの合併症はさらに、失明、尿毒症、脳卒中、心筋梗塞などの深刻な病態を招く危険性を有している。

糖尿病の治療方法としては、食事療法、運動療法などにより代謝機能の正常化を図る方法の他、グルコース代謝に必要とされるインスリンを注射により投与方法が行われている。

また、近年、インスリンを直接投与方法の他にも、インスリンの生成、インスリンの分泌などを促進することにより、血糖値の低下を実現させる方法などの研究も活発に行われている。

[0004] インスリン分泌を調節するペプチドホルモンとしてGLP-1 (glucagon-like peptide-1; グルカゴン様ペプチド1) が注目を浴びつつある。GLP-1は、回腸、大腸などに存在する腸内分泌細胞であるL細胞において生成されるプログルカゴンから翻訳後プロセッシングされて生じるペプチドホルモンである (Drucker, 1998)。グルコース濃度に応答してインスリンの分泌を誘導することから、特にII型 (インスリン非依存型) 糖尿

病の治療に効果を示す可能性が指摘されてきた(Drucker, 2001; Thorens及びWaeber, 1993)。さらに、 $\beta$ 細胞の増殖、又は幹細胞からの $\beta$ 細胞の新生を誘導する効果なども報告されており、II型糖尿病における $\beta$ 細胞のアポトーシスの遅延や、I型糖尿病に対する膵島移植の効果継続に有効であると推測される。

また、インスリン分泌の調節作用の他にも、中枢の視床下部に作用して「満腹感」の刺激、及び摂食の低減を誘導することが明らかとなっており(Turton等, 1996; Flint等, 1998)、糖尿病のみならず、肥満症を含む摂食障害への治療効果が期待されている。最近の研究によると、脂肪細胞から遊離される脂肪酸やTNFなどの物質がインスリンの作用を妨害することが明らかにされてきており、肥満による血糖値の上昇が促進される機構も解明されつつある。従って、インスリンの分泌を促進するだけでなく、肥満化をも抑制する効果を併せ持つGLP-1は糖尿病治療に対する画期的な治療剤を提供すると考えられる。

[0005] しかし、GLP-1を糖尿病の治療に適用するにあたり、生体内におけるGLP-1の半減期が非常に短いこと(Drucker, 2001; Thorens及びWaeber, 1993)、ペプチド性であるが故に投与に際し注射による方法を取らざるを得ない点などが障害となっていた。

このような問題点を克服する方法として、内在性のGLP-1の分泌を促進することでインスリン分泌の調節を図ることが考えられる。

これまでに、GLP-1の分泌促進には脂肪酸が関係するとの指摘がされている。例えば、ラットに対してモノ不飽和脂肪酸を与えるとGLP-1の分泌が促進され(非特許文献1)、また、オレイン酸、パルミチン酸によりヒト腸管細胞株(NCI-H716)からのGLP-1分泌が促進される(非特許文献2)などの報告が行われている。しかしながら、その一方では、ポリ不飽和脂肪酸またはモノ不飽和脂肪酸はGLP-1を介したインスリン分泌に影響を与えない(非特許文献3)、また、短鎖脂肪酸(SCFA)の血液への注入によって、血漿中のGLP-1濃度に変化は生じなかった(非特許文献4)など、前出の報告とは相反する結果も報告されている。さらに、ある種の脂肪酸がGLP-1の分泌を促進とした場合において、その作用機序については全く明らかにされておらず、この点においても、脂肪酸とGLP-1促進との関連性における信憑性が疑

間視されていた。

[0006] 本発明に係る組成物にはGタンパク質共役型レセプターであるGT01タンパク質、およびGT01タンパク質と特異的に結合するリガンドが含まれる。Gタンパク質共役型レセプターは、7個の膜貫通領域を有することから7回膜貫通型受容体(7TMR)と称されており(図1を参照のこと)、共役しているグアニンヌクレオチド結合タンパク質(以下、Gタンパク質と称する)の活性化を通じて、細胞内のシグナル伝達に関与している。

Gタンパク質共役型レセプターは、生体内の各機能細胞表面に存在し、それらの機能を調節するリガンド分子の標的となっており、該リガンド分子との結合を介して細胞内にシグナルを伝達している。伝達されたシグナルを受け取った細胞は、その細胞機能の活性化又は抑制化を受け、その結果、種々の生体内反応を惹起していく。従って、Gタンパク質共役型レセプターの機能を明らかにしていくことは、生体内反応をうまく調整する医薬を開発する点においても、非常に重要なこととなっている。

近年、膨大な量のゲノム及びcDNA情報が入手可能となり、多くのGタンパク質共役レセプターが同定されてきたが、未だ機能及びその特異的リガンドが明らかにされていないものも多く、その解析の進展が待たれている。

ヒトGT01タンパク質は、GPR120と称され、NP\_859529としてGenBankに登録されているアミノ酸配列と同一である。しかしながら、GPR120の機能に関しては全く言及されておらず、生物学的役割については不明である(非特許文献5)。

また、Gタンパク質共役レセプターである14273レセプターと95%のアミノ酸同一性を有する。しかしながら、14273レセプターはそのリガンドが特定されておらず、その作用機序の詳細は明らかになっていない。また、該14273レセプターは、心臓において発現が認められ、該レセプターをコードする遺伝子によるトランスジェニックマウスの解析から、14273レセプターは心臓疾患に関与するものとして同定されている。従って、本発明において開示されるGT01ポリペプチドと14273レセプターはアミノ酸配列上の同一性は高いものの、その機能の比較から(後述する)、生理学的に全く異なる役割を担っている可能性が考えられる(特許文献1または2を参照のこと)。

[0007] すでに、本発明の発明者らは、本発明に係るGT01タンパク質およびそのリガンド

の作用により、摂食制御に機能するCCKの分泌を促進することを見出している(特願2003-180375)。そして、さらに本発明において、GT01タンパク質およびそのアゴニストの作用により血糖値の低下に機能するGLP-1の分泌が促進され、さらに、インスリンの分泌も促進されることを見出した。従って、本発明に係るGT01タンパク質およびそのリガンドは摂食制御、血糖値の低下を可能ならしめることにより、肥満化を防止または軽減させ、併せて血糖値の低下を実現することにより糖尿病の治療に効果を発揮することが期待される。

特許文献1:米国特許第6, 448, 005B1号(全文)

特許文献2:特表2002-536997号公報(全文)

非特許文献1:Rocca, A. S. 等, Endocrinology 142:1148-1155, 2001

非特許文献2:Reimer, R. A. 等, Endocrinology 142:4522-4528, 2001

非特許文献3:Cuche, G. 等, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 279:G925-930, 2000

非特許文献4:Brynes, A. E. , Am J Clin Nutr 72:1111-1118, 2000.

非特許文献5:Fredriksson, R. 等, FEBS 554:381-388, 2003

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0008] そこで、本発明においては、インスリンの分泌を促進することによりI型およびII型糖尿病の治療において有用な内在性GLP-1の分泌を誘導ならしめる医薬組成物を提供することを目的とする。

さらに、GLP-1の分泌およびインスリンの分泌に好適なGT01タンパク質に対するリガンドを同定する方法、該リガンドとGT01タンパク質との結合性を変化させる化合物を得るためのスクリーニング方法、該スクリーニング用キットを提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者等は、上記事情に鑑み、GT01ポリペプチド(例えば、配列番号1及び2)の機能を解析し、そのリガンドとなる化合物を同定すべく、鋭意研究を行った結果、GT01ポリペプチドはヒト腸内分泌細胞表面に分布し、インスリン分泌の制御に機能す



るGLP-1の分泌を促進する機能を有し、さらには、実際にインスリン分泌が促進されることをここで初めて明らかにし、併せて、GT01ポリペプチドのリガンドとなる化合物を明らかにした。

なお、本明細書中においては、「ポリペプチド」と「タンパク質」なる用語は特に注記しないかぎり、同じ意味に用いられるものとする。

すなわち、上記課題は以下の(1)～(40)によって解決される。

(1)本発明の第1の発明に係る実施態様は、「配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列からなり、細胞からのGLP-1の分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。」である。

ここで「細胞」とは、特に注記しない限り哺乳動物細胞のことであり、特に、限定はしないが、生体内に存在して、GLP-1を放出する能力を有する細胞(例えば、腸内分泌細胞であるL細胞など)、又はin vitroにおいてGLP-1を放出する能力を有する株化細胞(例えば、STC-1細胞、NCI-H716細胞、GLUTag細胞)などを指す(本明細書中において以下同様)。

(2)本発明の第2の発明に係る実施態様は、「配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列のいずれかにおいて1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、細胞からのGLP-1の分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。」である。

(3)本発明の第3の発明に係る実施態様は、「配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、細胞からのGLP-1の分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。」である。

ここで、「配列同一性」とは、比較されるアミノ酸配列(例えば、ここでは配列番号1または配列番号2)とのアミノ酸一致率が最大になるようにギャップ等を導入して、比較するアミノ酸配列と比較されるアミノ酸配列を整列させた場合、同一となるアミノ酸数の比較されるアミノ酸配列に対する100分率のことである。

配列番号1と配列番号2で表されるアミノ酸配列をアミノ酸の一致率が最大になるように、ギャップ等を導入して両配列を整列させた場合、配列番号1で表されるアミノ酸

の83%が配列番号2で表されるアミノ酸配列と同一であった。配列番号1はヒトGT01のアミノ酸配列、配列番号2はマウスGT01のアミノ酸配列を表すことから、各々のアミノ酸配列と少なくとも83%以上の同一性を有するポリペプチドは、他の生物種におけるGT01ホモログであることが予想される。

(4) 本発明の第4の発明に係る実施態様は、「前記GLP-1が、インスリンの分泌を誘導する上記(1)乃至(3)のいずれかに記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。」である。

(5) 本発明の第5の発明に係る実施態様は、「腸内分泌細胞上に存在する上記(1)乃至(4)のいずれかに記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。」である。

(6) 本発明の第6の発明に係る実施態様は、「上記(1)乃至(5)に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。」である。

(7) 本発明の第7の発明に係る実施態様は、「上記(6)に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。」である。

(8) 本発明の第8の発明に係る実施態様は、「上記(7)に記載のベクターを有効成分として含んで成り、糖尿病に伴う高血糖値を低下させるための医薬組成物。」である。

(9) 本発明の第9の発明に係る実施態様は、「インスリンの分泌を誘導する上記(8)に記載の医薬組成物。」である。

(10) 本発明の第10の発明に係る実施態様は、「上記(1)乃至(5)のいずれかに記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩のリガンド。」である。

(11) 本発明の第11の発明に係る実施態様は、「直鎖または分岐の遊離脂肪酸である上記(10)に記載のリガンド。」である。

(12) 本発明の第12の発明に係る実施態様は、「前記遊離脂肪酸の炭素数が10〜24である上記(11)に記載のリガンド。」である。

(13) 本発明の第13の発明に係る実施態様は、「前記遊離脂肪酸の不飽和結合数が0〜6である上記(11)または(12)に記載のリガンド。」である。

(14) 本発明の第14の発明に係る実施態様は、「前記遊離脂肪酸が、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカノイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、マルガリン酸、パルミトレイン酸、エイコサトリエノイン酸、エライジン酸、ペト

ロセリニン酸、オレイン酸、 $\alpha$ リノレン酸、 $\gamma$ リノレン酸、ホモ $\gamma$ リノレン酸、アラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノール酸、エイコサテトラエン酸、バクセン酸からなるグループから選択される上記(13)に記載のリガンド。」である。

ここで、上記(14)に記載の脂肪酸に異性体が存在する場合、全ての異性体を含むものとするが、例えば、エイコサトリエノイン酸では、特にcis-5, 8, 11-エイコサトリエノイン酸が好ましく、エイコサジエン酸では、特にcis-11, 14-エイコサジエン酸が好ましく、エイコサトリエン酸では、特にcis-11, 14, 17-エイコサトリエン酸が好ましく、エイコサテトラエン酸では、特にcis-7, 10, 13, 16-エイコサテトラエン酸が好ましく、エイコサペンタエン酸では、cis-5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸、all-cis-7, 10, 13, 16, 19-エイコサペンタエン酸が好ましく、ドコサヘキサエン酸では、特にcis-4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸が好ましい。

(15)本発明の第15の発明に係る実施態様は、「上記(10)乃至(14)のいずれかに記載のリガンドを有効成分として含んで成り、糖尿病に伴う高血糖値を低下させるための医薬組成物。」である。

(16)本発明の第16の発明に係る実施態様は、「インスリンの分泌を誘導する上記(15)に記載の医薬組成物。」である。

(17)本発明の第17の発明に係る実施態様は、「上記(1)乃至(5)のいずれかに記載されたポリペプチドまたはその塩に対するリガンド候補物質の特異的結合能を調べる工程を含むことを特徴とする該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドの決定方法。」である。

(18)本発明の第18の発明に係る実施態様は、「上記(1)乃至(5)のいずれかに記載されたポリペプチドまたはその塩を使用することを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法。」である。

ここで「結合性を変化させる物質」には、該結合性を増強するように働く物質、および該結合性を低減させるように働く物質の両方が含まれる。

(19)本発明の第19の発明に係る実施態様は、「上記(1)乃至(5)のいずれかに記

載されたポリペプチドまたはその塩を構成要素として含むことを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング用キット。」である。

(20) 本発明の第20の発明に係る実施態様は、「糖尿病であるかまたは糖尿病の発生の危険性がある対象に由来する試料中における、上記(1)乃至(5)のいずれかに記載のポリペプチドまたはその塩を検出する方法であって、該ポリペプチドまたはその塩を特異的に認識する薬剤と該試料を接触させ、該ポリペプチドまたはその塩を検出することを特徴とする方法。」である。

(21) 本発明の第21の発明に係る実施態様は、「前記薬剤が、上記(1)乃至(5)のいずれかに記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に結合する抗体であることを特徴とする上記(20)に記載の方法。」である。

(22) 本発明の第22の発明に係る実施態様は、「前記薬剤を必須構成要素として含むことを特徴とする上記(20)または(21)に記載の方法に用いられるキット。」である。

(23) 本発明の第23の発明に係る実施態様は、「配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列からなり、細胞からのCCKの分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。」である。

ここで「細胞」とは、特に注記しない限り哺乳動物細胞のことであり、特に、限定はしないが、生体内に存在して、CCKを放出する能力を有する細胞(例えば、腸内分泌細胞であるL細胞など)、又はin vitroにおいてGLP-1を放出する能力を有する株化細胞(例えば、STC-1細胞、NCI-H716細胞、GLUTag細胞)などを指す(本明細書中において以下同様)。

(24) 本発明の第24の発明に係る実施態様は、「配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列のいずれかにおいて1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、細胞からのCCKの分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。」である。

(25) 本発明の第25の発明に係る実施態様は、「配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、細胞



からのCCKの分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。」である。

ここで、「配列同一性」とは、比較されるアミノ酸配列(例えば、ここでは配列番号1または配列番号2)とのアミノ酸一致率が最大になるようにギャップ等を導入して、比較するアミノ酸配列と比較されるアミノ酸配列を整列させた場合、同一となるアミノ酸数の比較されるアミノ酸配列に対する100分率のことである。

配列番号1と配列番号2で表されるアミノ酸配列をアミノ酸の一致率が最大になるように、ギャップ等を導入して両配列を整列させた場合、配列番号1で表されるアミノ酸の83%が配列番号2で表されるアミノ酸配列と同一であった。配列番号1はヒトGT01のアミノ酸配列、配列番号2はマウスGT01のアミノ酸配列を表すことから、各々のアミノ酸配列と少なくとも83%以上の同一性を有するポリペプチドは、他の生物種におけるGT01ホモログであることが予想される。

(26) 本発明の第26の発明に係る実施態様は、「腸内分泌細胞上に存在する上記(23)乃至(25)のいずれかに記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。」である。

(27) 本発明の第27の発明に係る実施態様は、「上記(23)乃至(26)に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。」である。

(28) 本発明の第28の発明に係る実施態様は、「上記(27)に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。」である。

(29) 本発明の第29の発明に係る実施態様は、「上記(28)に記載のベクターを有効成分として含んで成り、摂食障害を治療するための医薬組成物。」である。

(30) 本発明の第30の発明に係る実施態様は、「上記(23)乃至(26)のいずれかに記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩のリガンド。」である。

(31) 本発明の第31の発明に係る実施態様は、「直鎖または分岐の遊離脂肪酸である上記(30)に記載のリガンド。」である。

(32) 本発明の第32の発明に係る実施態様は、「前記遊離脂肪酸の炭素数が10〜24である上記(31)に記載のリガンド。」である。

(33) 本発明の第33の発明に係る実施態様は、「前記遊離脂肪酸の不飽和結合数

が0-6である上記(31)または(32)に記載のリガンド。」である。

(34) 本発明の第34の発明に係る実施態様は、「前記遊離脂肪酸が、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカノイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、マルガリン酸、パルミトレイン酸、エイコサトリエノイン酸、エライジン酸、ペトロセリニン酸、オレイン酸、 $\alpha$ リノレン酸、 $\gamma$ リノレン酸、ホモ $\gamma$ リノレン酸、アラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノール酸、エイコサテトラエン酸、バクセン酸からなるグループから選択される上記(33)に記載のリガンド。」である。

ここで、上記(34)に記載の脂肪酸に異性体が存在する場合、全ての異性体を含むものとするが、例えば、エイコサトリエノイン酸では、特にcis-5, 8, 11-エイコサトリエノイン酸が好ましく、エイコサジエン酸では、特にcis-11, 14-エイコサジエン酸が好ましく、エイコサトリエン酸では、特にcis-11, 14, 17-エイコサトリエン酸が好ましく、エイコサテトラエン酸では、特にcis-7, 10, 13, 16-エイコサテトラエン酸が好ましく、エイコサペンタエン酸では、cis-5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸、all-cis-7, 10, 13, 16, 19-エイコサペンタエン酸が好ましく、ドコサヘキサエン酸では、特にcis-4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸が好ましい。

(35) 本発明の第35の発明に係る実施態様は、「上記(30)乃至(34)のいずれかに記載のリガンドを有効成分として含んで成り、摂食障害を治療するための医薬組成物。」である。

(36) 本発明の第36の発明に係る実施態様は、「肥満症を治療するための上記(35)に記載の医薬組成物。」である。

(37) 本発明の第37の発明に係る実施態様は、「拒食症を治療するための上記(35)に記載の医薬組成物。」である。

(38) 本発明の第38の発明に係る実施態様は、「上記(30)乃至(34)のいずれかに記載のリガンドを有効成分として含んでなる。栄養補助組成物。」である。

(39) 本発明の第39の発明に係る実施態様は、「合理的なダイエットに用いられる上記(38)に記載の栄養補助組成物。」である。

(40) 本発明の第40の発明に係る実施態様は、「食欲不振の緩和に用いられる上記

(38)に記載の栄養補助組成物。」である。

(41)本発明の第41の発明に係る実施態様は、「上記(23)乃至(26)のいずれかに記載されたポリペプチドまたはその塩に対するリガンド候補物質の特異的結合能を調べる工程を含むことを特徴とする該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドの決定方法。」である。

(42)本発明の第42の発明に係る実施態様は、「上記(23)乃至(26)のいずれかに記載されたポリペプチドまたはその塩を使用することを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法。」である。

ここで「結合性を変化させる物質」には、該結合性を増強するように働く物質、および該結合性を低減させるように働く物質の両方が含まれる。

(43)本発明の第43の発明に係る実施態様は、「上記(23)乃至(26)のいずれかに記載されたポリペプチドまたはその塩を構成要素として含むことを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング用キット。」である。

(44)本発明の第44の発明に係る実施態様は、「摂食障害であるかまたは摂食障害の発生の危険性がある対象に由来する試料中における、上記(23)乃至(26)のいずれかに記載のポリペプチドまたはその塩を検出する方法であって、該ポリペプチドまたはその塩を特異的に認識する薬剤と該試料を接触させ、該ポリペプチドまたはその塩を検出することを特徴とする方法。」である。

(45)本発明の第45の発明に係る実施態様は、「前記薬剤が、上記(23)乃至(26)のいずれかに記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に結合する抗体であることを特徴とする上記(44)に記載の方法。」である。

(46)本発明の第46の発明に係る実施態様は、「前記薬剤を必須構成要素として含むことを特徴とする上記(44)または(45)に記載の方法に用いられるキット。」である。

## 発明の効果

[0010] 本発明により提供される医薬組成物を用いることにより、細胞からのGLP-1の分泌

およびインスリンの分泌を促進させることができる。その結果、膵臓の $\beta$ 細胞からのインスリンの分泌の促進、 $\beta$ 細胞の増殖、幹細胞からの $\beta$ 細胞の新生誘導などの効果が期待できる。

また、II型糖尿病における $\beta$ 細胞のアポトーシスの遅延、I型糖尿病に対する膵島移植の効果継続の効果が期待できる。

さらに、本発明により初めて明らかにされたGT01ポリペプチドに対するリガンドである遊離脂肪酸を含む医薬組成物を用いることで、GT01ポリペプチドを発現する腸内細胞からのCCK放出を調節することが可能となる。その結果、末梢又は中枢におけるCCK応答性の摂食制御機構の調節が可能となり、摂食障害及びそれに伴う疾患等の症状の改善を達成し得る。

さらにまた、本発明のGT01ポリペプチドに対するリガンドである遊離脂肪酸を含有する栄養補助剤を摂取することにより、合理的なダイエットの達成又は食欲増進効果を期待し得る。

[0011] また、本発明により提供される医薬組成物を用いることにより、「満腹感」を生じさせ、摂食の低減を誘導することが可能となるため、糖尿病の症状を亢進すると考えられる肥満をも抑制し、血糖値の低減を介した糖尿病の治療にさらなる効果が期待できる。

[0012] さらに、本発明により提供されるリガンドの決定方法、またはリガンドとGT01との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法を用いることで、GLP-1の分泌を効果的に制御し得る新規化合物の同定が可能となり、血糖値の低減を介した糖尿病の治療剤の開発が期待できる。

[0013] さらにまた、本発明により提供されるスクリーニング方法、またはスクリーニングキットを用いることで、GT01に対する既存のリガンドの結合様式を調節し得る新規化合物を同定することが可能となり、血糖値の低減を介した糖尿病の治療剤の開発が期待できる。

### 発明を実施するための最良の形態

[0014] 1. GT01ポリペプチドをコードする遺伝子のクローニング

本発明における「GT01ポリペプチド」とは、配列番号1または配列番号2で表され



るアミノ酸配列を有するGタンパク質共役型レセプター、または配列番号1もしくは配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、腸内分泌細胞(例えば、L細胞、)若しくは腸内分泌細胞株(例えば、STC-1、NCI-H716細胞、GLUTag細胞株等)表面に分布し、そのリガンドの結合により、GLP-1の分泌のためのシグナルを細胞内に伝達するGタンパク質共役型レセプターのことである。

- [0015] 本発明におけるGT01ポリペプチド遺伝子は、公的なデータベース(NCBI)に登録されている配列情報(登録番号;NM\_181748(マウス)、NM\_181745(ヒト)など)に基づいて作製されたPCRプライマーを用いて、cDNAライブラリー、ゲノムDNAライブラリー等からクローニングすることができる。

PCRプライマーの設計は、primer3

(Whitehead

Institute for Biomedical Research.)等のプライマー設計ソフトを用いて行うことができる。また、PCRプライマー合成は、標準的な合成技術、例えば、自動DNA合成装置などを用いて行うことができるが、商業的に入手してもよい。PCR反応によって増幅が予想される増幅産物の長さは、増幅効率およびその後のアガロースゲルによる分離能および塩基配列解析が容易であるような長さが好ましく、例えば、80〜200塩基になるようにデザインするのがよい。作成したPCRプライマーを用いて、cDNAライブラリー等を鋳型にしてPCR反応を行い、増幅産物が目的の産物であることを、配列決定を行うなどして確認する。

- [0016] ここで用いられる、cDNAライブラリーはヒトを含むあらゆる動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ウシ、サル、ヒツジ、イヌ、ネコなど)の細胞、限定はしないが、例えば、免疫系細胞、血球系細胞、線維芽細胞、脾細胞、肝細胞、骨髄細胞、すい臓細胞、ランゲルハンス細胞、上皮細胞、筋細胞、神経細胞、グリア細胞、脂肪細胞、若しくはこれらの株化細胞、若しくはこれらの前駆細胞などから調製したものでもよく、又はあらゆる動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ウシ、サル、ヒツジ、イヌ、ネコなど)の組織、限定はしないが、例えば、脳、脊髄、下垂体、胸腺、抹消血、脾臓、リンパ組織、下垂体、胃、すい臓、

腎臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などから調製したものでもよい。cDNAライブラリーの調製は、当該技術分野における通常の技術を用いて行うことができる(例えば、Sambrook等, 1989などを参照のこと)。

[0017] 2. GT01ポリペプチドに対するリガンド

本明細書中の「リガンド」とは、受容体に適合する化学分子のことで、「アゴニスト」および「アンタゴニスト」の両方の概念が含まれる。

また、本明細書中における「アゴニスト」には、内在性のGT01ポリペプチドの生物学的活性(リガンドの結合により、GLP-1の分泌のためのシグナルを細胞内に伝達する活性)を誘導する分子のいずれもが含まれる。一方「アンタゴニスト」には、アゴニストと競合することで、内在性GT01ポリペプチドの生物学的活性の一部または全てを阻害し、中和させる分子のいずれもが含まれる。本発明の「アゴニスト」は、限定はしないが、特に、GLP-1の分泌を促進する効果を有すると考えられる。

(1)リガンドの同定

GT01ポリペプチドの生物学的活性(リガンドの結合により、GLP-1分泌のためのシグナルを細胞内に伝達する活性)を検出ためのアッセイ系に試験されるべき化合物等を添加した場合、GT01ポリペプチドの生物学的活性が促進されれば、該化合物はアゴニストであり、逆に活性が抑制されれば、該化合物はアンタゴニストである。具体的には、限定はしないが、例えば、後述の実施例にて示す細胞内カルシウム濃度の測定において、該アッセイで使用する細胞に試験化合物を接触させた場合に、細胞内カルシウム濃度が上昇すれば、該試験化合物はアゴニストであり、アゴニストの存在下においても細胞内カルシウム濃度の上昇を阻害すれば、該試験化合物はアンタゴニストであると判断することができる。

[0018] (2)リガンドの同定方法

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のGT01タンパク質またはその部分ペプチドと候補物質(試験物質)とを接触させた場合のGT01タンパク質または該部分ペプチドに対する候補物質の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。より具体的には、本発明は、(i) 標識した試験化合物を、GT01タンパク質もし

くはその塩、またはGT01の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した候補物質のGT01もしくはその塩、またはGT01の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とするGT01タンパク質またはその塩に対するリガンドの同定方法、(ii) 標識した候補物質を、GT01タンパク質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した候補物質の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とするGT01に対するリガンドの同定方法、(iii) 標識した候補物質を、GT01タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したGT01タンパク質に接触させた場合における、標識した候補物質のGT01タンパク質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とするGT01に対するリガンドの同定方法、(iv) GT01タンパク質を含有する細胞に、候補物質を接触させた場合における、GT01タンパク質を介した細胞刺激活性(例えば、細胞内カルシウム濃度など)を測定することを特徴とするGT01タンパク質またはその塩に対するリガンドの同定方法、ならびに(v) 候補物質を、GT01をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによってその細胞膜上に発現した受容体タンパク質に接触させた場合における、受容体タンパク質を介する細胞刺激活性(例えば、細胞内カルシウム遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質リン酸化など)を測定することを特徴とする本発明のGT01タンパク質またはその塩に対するリガンドの同定方法を提供する。

本発明のリガンド同定方法に用いられるGT01タンパク質としては、GT01タンパク質またはその部分ペプチドを含有するものであればいずれであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたGT01タンパク質が特に好ましい。

[0019] (3) アンチセンスRNA又はDNA

GT01遺伝子に対する、アンチセンスRNA又はDNAは有効なアンタゴニストとして作用する可能性がある。アンチセンスRNA又はDNA分子は標的のmRNAに対してハイブリダイズして翻訳を阻害することにより標的因子の機能を阻害する。アンチセンスRNAは、例えば、in vivoにおいてmRNAとハイブリダイズし、mRNAからGT01ポリペプチドへの翻訳を阻害するようにデザインされる(Okano等, 1991)。また、DN

Aオリゴヌクレオチドは、例えば、GT01遺伝子の転写開始領域に対して相補的となるようにデザインされ、その結果GT01の発現を阻害する(Cohen, 1989)。

これらのアンチセンスRNA又はDNAがGT01ポリペプチドの発現を阻害するようi n vivoにおいて発現し得るように細胞へ導入することができる。アンチセンスDNAが用いられる場合には、例えば、標的遺伝子配列の約-10と+10の間の位置に結合するオリゴヌクレオチドであることが望ましい。

[0020] (4)抗GT01ポリペプチド抗体

本発明は、GT01ポリペプチドと特異的に結合する抗体、及びFab又は(Fab)<sub>2</sub>などの抗体断片を含む。

本明細書中の「抗体」(抗GT01;アゴニスト、アンタゴニスト及び中和抗体を含む)には、GT01ポリペプチドに対するモノエピトープ特異的抗GT01ポリペプチド抗体、ポリエピトープ特異的抗GT01ポリペプチド抗体、単一鎖抗体、及びこれらの断片が含まれる。

これらの抗体には、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体などが含まれる。

(4)-1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、例えば、哺乳類宿主動物に対して、免疫原及びアジュバントの混合物をインジェクトすることにより調製することができる。通常は、免疫原及び/又はアジュバントを宿主動物の皮下又は腹腔内へ複数回インジェクトする。免疫原にはGT01ポリペプチド及びその異種ポリペプチドとの融合体又はこれらの断片が含まれる。アジュバントの例には、完全フロイントアジュバント及びモノホスホリル脂質A合成-トレハロースジコリノミコレート(MPL-TDM)が含まれる。免疫応答を増強するために、免疫原は、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン、ウシチログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターなどの免疫原性を有するタンパク質に結合させたのち、インジェクトしてもよい。

あるいは、IgY分子を産生するニワトリを用いて調製してもよい(Schade等, 1996)。

抗体産生方法の詳細は、例えば、Ausubel等, 1987又はHarlow及びLane, 1988を参照のこと。



[0021] (4)-2. モノクローナル抗体

抗GT01ポリペプチドモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法を用いて調製される(Milstein及びCuello, 1983)。

この方法には以下に示す4つの工程が含まれる: (i) 宿主動物または、宿主動物由来のリンパ球を免疫する、(ii) モノクローナル抗体分泌性(又は潜在的に分泌性)のリンパ球を回収する、(iii) リンパ球を不死化細胞に融合させる、(iv) 所望のモノクローナル抗体(抗GT01ポリペプチド)を分泌する細胞を選択する。

マウス、ラット、モルモット、ハムスター、又は他の適当な宿主動物が免疫動物として選択され、免疫原がインジェクトされる。あるいは、免疫動物から取得したリンパ球を*in vitro*で免疫化してもよい。ヒト細胞が望ましい場合には、末梢血リンパ球(PBLs)が一般に使用される。しかしながら、他の哺乳類由来の脾臓細胞又はリンパ球がより一般的で好ましい。免疫原には、GT01ポリペプチド及びその異種ポリペプチドとの融合体又はこれらの断片が含まれる。

免疫後、宿主動物から得られたリンパ球はハイブリドーマ細胞を樹立するために、ポリエチレングリコールなどの融合剤を用いて不死化細胞株と融合される(Goding, 1996)。融合細胞としては、トランスフォーメーションによって不死化された齧歯類、ウシ、又はヒトのミエローマ細胞が使用されるか、ラットもしくはマウスのミエローマ細胞株が使用される。細胞融合を行った後、融合しなかったリンパ球及び不死化細胞株の成長又は生存を阻害する一又は複数の基質を含む適切な培地中で細胞を生育させる。通常の技術では、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠く親細胞を使用する。この場合、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンがHGPRT欠損細胞の成長を阻害し、ハイブリドーマの成長を許容する培地(HAT培地)に添加される。

[0022] モノクローナル抗体の調製にあたり、好ましい不死化細胞株はマウスミエローマ株で、アメリカンタイプカルチャーコレクション(Manassas, VA)より入手可能である。ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株による、ヒトモノクローナル抗体産生に関しては、Kozbor等, 1984を参照のこと。

ハイブリドーマ細胞は細胞外に抗体を分泌するため、GT01ポリペプチドに対する

モノクローナル抗体の産生の有無に関し、培養液を用いて確認することができる。産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、ラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)などの免疫沈降又はin vitroでの結合アッセイにより評価することができる(Harlow及びLane, 1988; Harlow及びLane, 1999)。

抗GT01ポリペプチドモノクローナル抗体分泌性ハイブリドーマ細胞は限界希釈法及びサブカルチャーにより単一クローンとして単離することができる(Goding, 1996)。適切な培地にはダルベッコ改変イーグル培地、RPMI-1640、場合によっては、タンパク質を含まない培地もしくは無血清培地などが含まれる(例えば、Ultra DOMA PF、またはHL-1; Biowhittaker; Walkersville, MD)。また、ハイブリドーマ細胞は、適切な宿主動物の腹水中で増殖させてもよい。

[0023] モノクローナル抗体は、培地又は腹水からプロテインAセファロース、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、硫酸沈殿又はアフィニティークロマトグラフィー(Harlow及びLane, 1988; Harlow及びLane, 1999)などの当業者にとって周知の方法によって単離及び精製される。

また、モノクローナル抗体は遺伝子組換え技術によっても作製することができる(米国特許第4, 166, 452号)。抗GT01ポリペプチド抗体を分泌するハイブリドーマ細胞株から目的のモノクローナル抗体ポリペプチドをコードする遺伝子を同定するのに、例えば、マウスの重鎖及び軽鎖抗体遺伝子と特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを用いてもよい。その結果、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子が取得された場合は、その遺伝子の配列を決定することにより目的の抗体遺伝子を同定することができる。同定され、単離された抗体遺伝子のDNA断片は、モノクローナル抗体を発現させるために、適当な発現ベクターに導入し、該ベクターを他のIgタンパク質を生産しないsimian COS-7細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又はミエローマ細胞などの宿主細胞中へトランスフェクトする。単離されたDNA断片は、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインに対するコード化配列を相同なマウス配列と置換することにより(米国特許第4, 816, 567号; Morrison等, 1987)、又は非Igポリペプチドをコードする配列の全て又は一部とIgコード化配列を融合することにより、修飾することができる。そのような非Igポリペプチドは、キメラ二価抗体を作製するために、抗体の

定常ドメインと置換することが可能であり、又は抗原結合部位の定常ドメインと置換することができる。

[0024] (4)－3. ヒト化及びヒト抗体

抗GT01ポリペプチド抗体には、ヒト化又はヒト抗体が含まれる。非ヒト抗体のヒト化型は、非ヒトIg由来の最小配列を含むキメラIgs、Ig鎖又は断片(Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>又は他の抗体の抗原結合領域など)である。

一般に、ヒト化抗体は非ヒト由来のIgから導入された一又は複数のアミノ酸残基を持つ。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、可変ドメインから選ばれる。ヒト化抗体は、例えばマウスのCDRs又はCDR配列と対応するヒト抗体配列とを置換することにより作製することができる(Jones等, 1986; Riechmann等, 1988; Verhoeyen等, 1988)。つまり、ヒト化抗体とは、典型的には、ヒトIg中の特定のCDR残基がマウスの相当部位由来のCDR残基と置換されているヒト抗体のことである。ヒト化抗体には、マウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種のCDRであって、抗原に対する所望の特異的親和性を持つ残基により、置換されるヒトIgsが含まれる。また、非ヒト由来の残基によって、ヒトIgのFvフレームワーク残基が置換される場合もある(Jones等, 1986; Presta, 1992; Riechmann等, 1988)。

[0025] (5) GT01ポリペプチドに対するリガンド

リガンドを決定する方法においては、GT01受容体タンパク質と試験化合物(候補リガンド)とを接触させた場合の、例えば、該受容体タンパク質の細胞内移行を確認する方法、該受容体タンパク質を発現する細胞の刺激活性を測定する方法などが使用可能であり、当業者における通常の技術常識の範囲内において実施可能である。

[0026] 具体的には、例えば、本発明におけるGT01受容体タンパク質と蛍光タンパク質(例えば、GFP、CFP、YFP又はDsREDなど)とのキメラ融合タンパク質を発現するための発現ベクターを試験細胞表面上に発現させ、試験化合物と接触させた場合の該キメラタンパク質の細胞内移行を蛍光顕微鏡等で観察することにより、試験化合物がリガンド(アゴニスト又はアンタゴニスト)として機能し得るか否か検討することができる。蛍光タンパク質とのキメラ融合タンパク質を発現させるベクターは、市販品(例えば、pDsRed、pEGFP、pCFPなど、Clontech社)などの蛍光タンパク質遺伝子が挿

入されたベクターに本発明のGT01遺伝子のフレームが合うように挿入することで、構築することができる。

また、GT01受容体タンパク質を細胞表面上に発現させる細胞と試験化合物を接触させた場合において、受容体タンパク質を介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、イノシトールリン酸産生など)を検出することによっても候補リガンドを同定することができる。本発明においては、細胞内の遊離 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を測定する方法が用いられる。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の測定は、当業者にとって周知の技術を用いることで実施することが可能である。例えば、 $\text{Ca}^{2+}$ と結合することで蛍光を発する蛍光物質を用いる方法が一般的によく用いられる。

本発明において好ましいリガンド同定の方法は、蛍光タンパク質とGT01受容体タンパク質のキメラ融合体を用いた細胞内移行による方法、及び細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を検出する方法である。

#### [0027] 3. 細胞培養

本発明のGT01ポリペプチドのリガンドを同定するために、適切な細胞表面上に該ポリペプチドを機能し得る状態で発現させる必要がある。

ここで使用可能な細胞には、哺乳動物細胞及びその株化細胞であれば利用可能である。適切な細胞又は細胞株は、当業者であれば容易に選択することができる。例えば、CHO細胞、STC-1細胞、GLUTag細胞又はHEK細胞などが利用可能である。

細胞を培養する際、培地としては、例えば、約5〜20%の胎児牛血清を含むMEM培地、DMEM培地等が用いられ、必要に応じてグルコース、グルタミン、抗生物質等が適宜添加される。pHは約6〜8であるのが好ましく、温度は約37°C、 $\text{CO}_2$ 濃度は約5%が望ましい。

#### [0028] 4. GT01ポリペプチドの哺乳動物細胞内での発現

本発明のリガンドを同定するために、GT01ポリペプチドを、適切な哺乳動物細胞内で発現させ、該細胞表面上に分布させる必要がある。

GT01ポリペプチドの安定発現株を得るために、適切なベクター(pCDNなど)に本



発明のGT01ポリペプチド(実質的に同一なポリペプチド及びそれらの部分ペプチドも含む。本明細書中において同様)のみ、又は他のタンパク質(例えば、GFP、G16など)との融合体ポリペプチドをコードするDNAを挿入し、該ベクターを目的の細胞内へ導入する。

動物細胞へのベクターの導入方法としては、DEAEデキストラン法(Lopata等, 1984)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(Chen及びOkayama, 1988)、カチオン性脂質による方法(Elroy-Stein及びMoss, 1990)等が挙げられる。

また、安定にトランスフォームされた組換え体細胞を選択するためのマーカーとしては、限定はしないが、ハイグロマイシン耐性マーカー(Hyg<sup>r</sup>)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(dhfr)、アンピシリン耐性遺伝子(Amp<sup>r</sup>)、カナマイシン耐性遺伝子(Kan<sup>r</sup>)、ネオマイシン耐性遺伝子(Neo<sup>r</sup>, G418)などが利用可能である。

[0029] 5. GT01ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストを含む医薬組成物

GT01ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストは、薬理学的に受容可能な担体と共に、生体に対して悪影響を及ぼさない医薬組成物の形態で治療剤として使用され得る。

「薬理学的に受容可能な担体」は、溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌及び抗真菌剤、アイソトニックに作用して吸着を遅らせる薬剤及びその類似物を含み、薬剤的投与に適するもののことである(Gennaro, 2000)。該担体及び該担体を希釈するために好ましいものの例には、限定はしないが、水、生理食塩水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、及び5%のヒト血清アルブミンが含まれる。また、リポソーム及び不揮発性油などの非水溶性媒体も用いられる。さらに、本発明のGT01ポリペプチド及び抗GT01ポリペプチド抗体を含む該ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストの活性を保護又は促進するような、特定の化合物も該組成物中に取り込まれ得る。

[0030] (1) 医薬組成物の調製

本発明の医薬組成物は、静脈内、経口への投与、胃への直接投与を含む、治療上適切な投与経路に適合するように製剤化される。静脈内への投与、または胃への直接投与に使用される溶液又は懸濁液には、限定はしないが、注射用の水などの滅菌的希釈液、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、ブ

ロピレングリコール、又は他の合成溶媒、ベンジルアルコール又は他のメチルパラベンなどの保存剤、アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなどの無痛化剤、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)などのキレート剤、酢酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩などの緩衝剤、塩化ナトリウム又はデキストロースなど浸透圧調製のための薬剤を含んでもよい。

pHは塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整することができる。非径口的標品はアンプル、ガラスもしくはプラスチック製の使い捨てシリンジ又は複数回投与用バイアル中に収納される。

[0031] (2) 注射可能な製剤

注射に適する医薬組成物には、滅菌された注射可能な溶液又は分散媒であって、使用時に調製するための滅菌水溶液(水溶性の)又は分散媒及び滅菌されたパウダー(凍結乾燥されたタンパク質、核酸などを含む)が含まれる。静脈内の投与に関し、適切な担体には生理食塩水、静菌水、CREMOPHOR EL<sup>TM</sup>(BASF, Parsippany, N.J.)、又はリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)が含まれる。注射剤として使用する場合、組成物は滅菌的でなくてはならず、また、シリンジを用いて投与されるために十分な流動性を保持していなくてはならない。該組成物は、調剤及び保存の間、化学変化及び腐食等に対して安定でなくてはならず、細菌及び真菌などの微生物由来のコンタミネーションなどが生じてはならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど)、及び適切な混合物を含む溶媒又は分散媒培地を使用することができる。例えば、レクチンなどのコーティング剤を用い、分散媒においては必要とされる粒子サイズを維持し、界面活性剤を用いることにより適度な流動性が維持される。種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、及びチメロサルなど、は、微生物のコンタミネーションを防ぐために使用可能である。また、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール及び塩化ナトリウムのような等張性を保つ薬剤が組成物中に含まれてもよい。吸着を遅らせることができる組成物には、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの薬剤が含まれる。

滅菌的な注射可能な溶液は、必要な成分を単独で又は他の成分と組み合わせた後

に、適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を加え、滅菌することで調製される。一般に、分散媒は、基本的な分散培地及び上述したその他の必要成分を含む滅菌的媒体中に活性化化合物を取り込むことにより調製される。滅菌的な注射可能な溶液の調製のための滅菌的なパウダーの調製方法には、活性な成分及び滅菌溶液に由来する何れかの所望な成分を含むパウダーを調製する真空乾燥及び凍結乾燥が含まれる。

[0032] (3) 経口組成物

通常、経口組成物には、不活性な希釈剤又は体内に取り込んでも害を及ぼさない担体が含まれる。経口組成物には、例えば、ゼラチンのカプセル剤に包含されるか、加圧されて錠剤化される。経口的治療のためには、活性化化合物は賦形剤と共に取り込まれ、錠剤、トローチ又はカプセル剤の形態で使用される。また、経口組成物は、流動性担体を用いて調製することも可能であり、流動性担体中の該組成物は経口的に適用される。さらに、薬剤的に適合する結合剤、及び／又はアジュバント物質などが包含されてもよい。

錠剤、丸薬、カプセル剤、トローチ剤及びその類似物は以下の成分又は類似の性質を持つ化合物の何れかを含み得る：微結晶性セルロースのような賦形剤、アラビアゴム、トラガント又はゼラチンなどの結合剤；スターチ又はラクトース、アルギン酸、PRIMOGE、又はコーンスターチなどの膨化剤；ステアリン酸マグネシウム又はSTRROTESなどの潤滑剤；コロイド性シリコン二酸化物などの滑剤；スクロース又はサッカリンなどの甘味剤；又はペパーミント、メチルサリシル酸又はオレンジフレーバーなどの香料添加剤。

[0033] (5) 全身投与

また、全身投与は経粘膜的又は経皮的に行うことができる。経粘膜的又は経皮的投与について、標的のバリアーを透過することができる浸透剤が選択される。経粘膜浸透剤は界面活性剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体が含まれる。経鼻スプレー又は坐薬は経粘膜的な投与に対して使用することができる。経粘膜的投与に対して、活性化化合物はオintメント、軟膏、ジェル又はクリーム中に製剤化される。

また、化合物は、直腸への送達に対して、坐薬（例えば、ココアバター及び他のグリ

セリドなどの基剤と共に)又は滞留性の浣腸の形態で調製することもできる。

#### (6)担体

本発明のGT01ポリペプチド及び抗GT01ポリペプチド抗体を含む該ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストは、植込錠及びマイクロカプセルに封入された送達システムなどの制御放出製剤として、体内から即時に除去されことを防ぎ得る担体を用いて調製することができる。エチレンビニル酢酸塩、ポリエチレングリコール、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの、生物分解性、生物適合性ポリマーを用いることができる。このような材料は、ALZA Corporation(Mountain View, CA)及びNOVA Pharmaceuticals, Inc.(Lake Elsinore, CA)から入手することが可能で、また、当業者によって容易に調製することもできる。また、リポソームの懸濁液も薬学的に受容可能な担体として使用することができる。有用なリポソームは、限定はしないが、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG誘導ホスファチジルエタノール(PEG-PE)を含む脂質組成物として、使用に適するサイズになるように、適当なポアサイズのフィルターを通して調製され、逆相蒸発法によって精製される。例えば、抗体のFab'断片などは、ジスルフィド交換反応を介して、リポソームに結合させてもよい(Martin及びPapahadjopoulos, 1982)。詳細な調製方法は、例えば、Eppstein等, 1985;Hwang等, 1980中の記載を参照のこと。

#### [0034] (7)投与量

本発明のGT01ポリペプチド又は該ポリペプチドをコードする遺伝子等による特定の疾患の治療又は予防において、適切な投与量レベルは、投与される患者の状態、投与方法等に依存するが、当業者であれば、容易に最適化することが可能である。

注射投与の場合は、例えば、一日に患者の体重あたり約0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ から500mg/kgを投与するのが好ましく、一般に一回又は複数回に分けて投与され得るであろう。好ましくは、投与量レベルは、一日に約0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ から約250mg/kgであり、より好ましくは一日に約0.5ー約100mg/kgである。

経口投与の場合は、組成物は、好ましくは1.0から1000mgの活性成分を含む錠剤の形態で提供され、好ましくは治療されるべき患者に対する投与量に含まれる有効活性成分は、1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 50.0, 75.0



, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 400.0, 500.0, 600.0, 750.0, 800.0, 900.0, 及び1000.0mgである。化合物は1日に1〜4回の投与計画で、好ましくは1日に1回又は2回投与される。

[0035] (8) 単位投与量

医薬組成物又は製剤は、一定の投与量を保障すべく、均一単位投与量により構成されなくてはならない。単位投与量とは、患者の治療に有効な一回の投与量を含み、薬学的に受容可能な担体と共に製剤化された一単位のことである。本発明の単位投与量を決定する場合には、製剤化される化合物(例えば、遊離脂肪酸、抗GT01ポリペプチド抗体など)の物理的、化学的特徴、期待される治療上の効果、及び該化合物に特有な製剤化における留意事項等により影響を受ける。

[0036] 6. 遺伝子治療組成物

本発明において開示される核酸分子(例えば、GT01ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが挿入されたベクターなど)を患者の細胞に導入するために、in vivo及びex vivoという2つの主要な方法がある。in vivo送達においては、治療が必要とされる患者の部位に直接注入される。ex vivo処理では、治療が必要とされる患者の部位の細胞を単離し、単離された細胞に製剤化した核酸分子を導入し、導入された細胞を患者に直接又は、例えば、患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与することができる(米国特許第4,892,538号及び第5,283,187号参照)。核酸分子を生細胞に導入するために利用可能な技術は、培養細胞等にin vitroで導入するか、又は患者にin vivoで導入するかに依存して選択される。哺乳動物細胞にin vitroで核酸分子を導入するのに適した技術としては、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、トランスフェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法などが挙げられる。トランスフェクションには、組換えウイルス(好ましくはレトロウイルス)粒子の細胞レセプターとの結合、次いで粒子に含まれる核酸分子の細胞への導入が含まれる。遺伝子のex vivo送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスである。

[0037] 現在、in vivo核酸移入技術で好ましいのは、ウイルス又は非ウイルスベクター(アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ関連ウイルス(AA

V))、及びカチオン性脂質ベースの系(遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPE、及びDC-Cho1である;例えば、Tonkinson等, Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996) 参照)を利用した系が含まれる。遺伝子治療で使用するために最も好ましいベクターはウイルスであり、その中でも、最も好ましくはアデノウイルス、AAV、レンチウイルス又はレトロウイルスである。レトロウイルスベクター等のウイルスベクターには、少なくとも1つの転写プロモーター/エンハンサー又は位置決定因子などが含まれる。さらに、レトロウイルスベクター等のウイルスベクターは、例えば、GT01ポリペプチドをコードする遺伝子を含んだ状態で転写される場合、該コード化遺伝子の翻訳を可能とするシスエレメント、即ち翻訳開始配列として機能する核酸配列を含む。このようなベクター構築物は、用いるウイルスに適したパッケージングシグナル、末端反復配列(LTR)又はその一部を含む。場合によっては、ベクター構築物は、ポリアダニル化並びに翻訳終結配列も含む。例えば、5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、DNA合成の開始点、及び3'LTR又はその一部を含む。非ウイルス性の他のベクターは、例えばカチオン性脂質、ポリリジン、及びデンドリマーを用いることもできる。

場合によっては、治療に用いる核酸を目的の細胞にターゲティングする試薬、例えば、細胞表面膜タンパク質を特異的な抗体などと共に提供するのが望ましい。現在知られている遺伝子標識化及び遺伝子治療プロトコルの概説については、Anderson等, Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。好適な遺伝子治療及びレトロウイルス粒子及び構造タンパク質の作成方法は、米国特許第5, 681, 746号を参照のこと。

#### [0038] 7. 医薬組成物に関するキット

医薬組成物はキット、容器、パック中に投与の説明書と共に含めることができる。本発明に係る医薬組成物がキットとして供給される場合、該医薬組成物のうち異なる構成成分が別々の容器中に包装され、使用直前に混合される。このように構成成分を別々に包装するのは、活性構成成分の機能を失うことなく、長期間の貯蔵を可能ならしめるためである。

##### (1) 容器

キット中に含まれる試薬は、構成成分が活性を長期間有効に持続し、容器の材質によって吸着されず、変質を受けないような何れかの種類の容器中に供給される。例えば、封着されたガラスアンプルは、窒素ガスのような中性で不反応性ガスの下において包装されたバッファーを含む。アンプルは、ガラス、ポリカーボネート、ポリスチレンなどの有機ポリマー、セラミック、金属、又は試薬を保持するために通常用いられる他の何れかの適切な材料などから構成される。他の適切な容器の例には、アンプルなどの類似物質から作られる簡単なボトル、及び内部がアルミニウム又は合金などのホイルで裏打ちされた包装材が含まれる。他の容器には、試験管、バイアル、フラスコ、ボトル、シリンジ、又はその類似物が含まれる。容器は、皮下用注射針で貫通可能なストッパーを有するボトルなどの無菌のアクセスポートを有する。

## (2) 使用説明書

また、キットには使用説明書も添付される。当該医薬組成物からなるキットの使用説明は、紙又は他の材質上に印刷され、及び／又はフロッピー（登録商標）ディスク、CD-ROM、DVD-ROM、Zipディスク、ビデオテープ、オーディオテープなどの電氣的又は電磁的に読み取り可能な媒体として供給されてもよい。詳細な使用説明は、キット内に実際に添付されていてもよく、あるいは、キットの製造者又は分配者によって指定され又は電子メール等で通知されるウェブサイトに掲載されていてもよい。

### [0039] 8. GT01ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストを含む栄養補助組成物又は栄養補助食品

GT01ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストを用いて、本発明に係る新規栄養補助組成物又は栄養補助食品とする場合、通常、食品の形態は特には限定されず、通常、食品として長期間摂取することができる形状としたものが良く、例えば、錠剤、顆粒状、散剤、清涼飲料水、菓子、パン、マーガリン等を例示することができる。また、通常食品に用いられている添加物、増量剤、香料、甘味料、増粘剤等を本発明の効果が損なわれない範囲で適宜混合することができる。

### [0040] 9. GT01タンパク質及びその部分ペプチドのその他の医学薬学的応用

本発明に係るGT01タンパク質およびその部分ペプチドまたはそれらの塩、ならび

にそれらをコードするポリヌクレオチドは、(i) GT01タンパク質に対するリガンド(アゴニスト)の決定、(ii) GT01タンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、(iii) 遺伝子診断剤、(iv) GT01タンパク質に対するリガンドの定量、(v) GT01タンパク質とリガンドとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング、(vi) GT01タンパク質とリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、(vii) GT01タンパク質またはその部分ペプチドの定量、(viii) GT01タンパク質またはその部分ペプチドに対する抗体による中和、(ix) GT01タンパク質をコードする遺伝子を有する非ヒト動物の作成などに用いることができる。特に、本発明の組換え型GT01タンパク質の発現系を用いた受容体結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なGT01タンパク質に対するリガンドの結合性を変化させる物質(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト)をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

[0041] 具体的には、本発明のGT01タンパク質もしくはその部分ペプチド、またはそれらの塩は、GT01タンパク質に対するリガンド(アゴニスト)またはアンタゴニストをスクリーニングし、または同定するための試薬として有用である。これらの試薬は、GT01タンパク質に対するリガンドの結合性を変化させる物質のスクリーニング用キットの構成要素とすることが可能である。以上のように、本発明は、GT01タンパク質もしくはその部分ペプチド、またはそれらの塩と、試験物質との接触させることを特徴とするGT01タンパク質に対するリガンド(アゴニスト)またはアンタゴニストの決定方法を提供する。試験物質としては、ヒトまたは哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物、細胞培養上清、人工的に合成した化合物等が挙げられる。

[0042] 本発明のGT01タンパク質またはその塩に対するリガンドを決定する方法を実施するためには、適当なGT01タンパク質画分と、標識した試験物質が用いられる。GT01タンパク質画分としては、天然のGT01タンパク質画分、またはそれと同等の活性を有する組換え型GT01タンパク質画分等が好ましい、例えば、GT01タンパク質またはその塩に対するリガンドの決定を行うには、まずGT01タンパク質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりGT01標品



を調製する。バッファーとしては、リン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと受容体タンパク質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80、デオキシコレートなどの界面活性剤や、ウシ血清アルブミンやゼラチン等のタンパク質をバッファーに加えることもできる。GT01タンパク質を含む溶液に、一定量の放射性標識した試験物質を共存させる。非特異的結合量を知るために大過剰の未尿式の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は焼く4-50℃、好ましくは約4℃-37℃で、約10分-24時間、望ましくは約30分-3時間行う。反応後、ろ過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ろ紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で計測する。全結合量から非特異的結合量を引いたカウントが0cpmを越える試験物質を本発明のGT01タンパク質またはその塩に対するリガンド(アゴニスト)として選択することができる。

[0043] 以下の実施例は例示するためにのみ提供されるものであって、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

## 実施例 1

### [0044] GT01遺伝子のクローニング

ヒト臓器RNAパネル中の回腸totalRNA、および、マウス回腸から抽出したtotalRNA 5  $\mu$ gから、SuperScriptII (Invitrogen社)に添付の方法で、Random primer (Takara社)を用いてTotalRNA 5  $\mu$ gから逆転写を行い、cDNAを作成した。反応後、5'側プライマー(5'-ATGTCCCCTGAATGCGCGCGGG-3') (配列番号3)及び3'側プライマー(5'-GCCAGAAATAATCGACAAGTCA-3') (配列番号4)を使用し、TaKaRa EX Taq (Takara社)を用いてRT-PCRを行った。PCR反応は、cDNAの変性を95℃で2分間行った後、96℃30秒間、52℃30秒間、72℃2分間のサイクル反応を35回行い、PCR産物を増幅させた。そして、産物の伸長反応を72℃で5分間行い、4℃に冷却して反応を停止した。PCR断片を pGEM-T easy (Promega社)ベクターにサブクローニングした後、塩基配列を決定した。ヒト、マ

ウスのそれぞれの断片を、制限酵素で切り出し、全体を、発現ベクターpIRES (Clonotech社) ベクターのプロモーター下流に載せ、全長を発現するものとした。また、PCRする際に、ストップコドンを除いたプライマーを作成し同様の手順で全長のcDNAを作成した。得られたcDNAは、pEGFP-N3 (Clonotech社) 発現ベクターと、又は当該発現ベクターのEGFP配列部分をG16に置換した発現ベクターへ導入することで、EGFPまたはG16との融合タンパクを作成できる発現ベクターとした。

## 実施例 2

### [0045] GT01遺伝子発現の組織分布

#### (1) 組織の調製

雄C57BL/6系マウスをエーテルで麻酔し、4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸バッファーpH7.4を用いて灌流固定を行った。そして、結腸の一部を採取し、冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で内容物を除去した後、4℃で1日固定した。その後、4℃にて2日間以上20%ショ糖/0.1Mリン酸バッファーpH7.4に置換した。置換された試料はO. C. T Compoundを用いて液体窒素で凍結させ、使用時まで-80℃で保存した。新鮮凍結試料の作成については、以下のように行った。同系統の雄マウスをエーテルで麻酔し、空腸、結腸の一部採取した後、冷PBSで腸管内容物を洗浄した。試料は軽く水気を切り、速やかにO. C. T Compoundで包埋し、液体窒素で凍結させ、使用時まで-80℃で保存した。

#### [0046] (2) RT-PCR

採取したマウス各臓器から、ISOGEN (日本ジーン) を用いてTotalRNAを抽出した。得られたTotalRNA 5mgから、Ready-To-Go You Prime First-Strand Beads (Amersham Bioscience社、Sweden) を用いてRT反応を行いcDNAを作成した。反応後、5'側プライマー(5'-CGCACCCGCTTTCCCTTCTTCTC-3' (配列番号3))及び3'側プライマー(5'-AGCTCT TTCCTTGATGCCTTTGTGA-3' (配列番号4))を使用し、TaKaRa EX Taq (Takara社) を用いてRT-PCRを行った。PCR反応は、cDNAの変性を95℃で2分間行った後、96℃30秒間、52.3℃30秒間、72℃2分間のサイクル反応を35回行い、PCR産物を増幅させた。そして、産物の伸長反応を72℃で5分間行い、4℃に冷却して反応を停止した。

## [0047] (3) サザンハイブリダイゼーション

RT-PCR反応後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、泳動産物をニトロセルロース膜に転写させた。サザンハイブリダイゼーションのプローブを作成するため、まずpGEM-T Easy Vector (Takara社) に組み込まれたマウスのGT01遺伝子の配列(配列番号5)を制限酵素BssHI、BglIIでそれぞれ切断し、1%アガロースゲルで泳動を行った。目的のバンドを切り出した後、GENECLEAN II (Q-BIOgene社、USA) でDNAを精製し、これをプローブ作成の為に鋳型とした。マウスのGT01遺伝子特異的DNAプローブは、 $^{32}\text{P}$ 標識dCTP (NEN社、USA) を用い、Random Primer DNA labeling Kit Ver.2 (Takara社) により作成した。サザンブロットを行った膜に、ハイブリダイゼーションバッファー(5xSSC、5xDenhardt's Solution、0.5% SDS) 中で $^{32}\text{P}$ 標識DNAプローブを加え、55°Cにて一晩反応させた。ハイブリダイゼーション後、55°C、10分間にて2 x SSC/0.1% SDS、続いて0.2 x SSCでプローブの洗浄を行った。これを富士イメージングプレート(富士フィルム社)に露光し、画像解析装置(STORM 860、Amersham Bioscience社、Sweden)によりスキニングを行った。

## [0048] (4) 結果

GT01遺伝子発現の組織分布の結果は図1に示す。盲腸、大腸、において高頻度に発現されており、脳、肺でも比較的多くの発現がみられ、直腸、脾臓、島細胞にも発現がみられた。また、腸内分泌細胞株であるSTC-1細胞においても多く発現されていることが確認された。これに対し、心臓、肝臓、腎臓における発現は少なかった(図2)。

## 実施例 3

[0049] CCK免疫組織化学(特願2003-180375明細書参照)

マウス空腸新鮮凍結切片をクリオスタット(LEICA CM1800; Leica)を用いて8 mmに剥切し、APSコートスライドガラス(松浪ガラス)に張り付け-20°Cで風乾した。そして、切片をZamboni液で30分固定し、流水洗浄を10分行った。内因性ペルオキシターゼの阻止のために、0.5%メタ過ヨウ素酸ナトリウム処理を10分を行い、10分流水にて洗浄した。抗CCK抗体の非特異反応のブロッキングは抗体希釈液(1%正常ウ

マ血清、0.4% Triton-X 100、PBS希釈)で1時間行い、PBSで洗浄した。スライドグラスを湿潤箱に移し、ウサギ抗CCK抗体(1:4000、AB1972、Chemicon、USA)を室温で一晩反応させた。反応後、PBSで5分3回洗浄し、ビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG(1:2000、Cat. No. 55701、ICN Pharmaceuticals、USA)を室温にて2時間反応させ、PBSで5分3回洗浄した。続いてavidin-biotin-peroxidase複合体(VECTASTAIN ABC KIT、Vector Labs、USA)を40分間反応させ、PBSで5分3回洗浄した。その後、DAB反応液(0.02% 3,3-diaminobenzidine-tetrahydrochloride、0.06% 過酸化水素水を含む50mM トリス緩衝液 pH7.6)で発色させた。発色後、流水洗浄を10分行い、エタノール・キシレン系列で脱水・透徹を行った後、標本用封入剤(MP500、松浪ガラス)を用いて試料を封入した。

#### 実施例 4

##### [0050] インサイツ(in situ)ハイブリダイゼーション

###### (1) cRNAプローブの作成

pGEM-T Easy Vector (TaKaRa)に組み込まれたマウスGT01の配列をsenseプローブ作成用に制限酵素SpeI、並びにanti senseプローブ作成用として制限酵素NcoIを用いて、それぞれ切断した。得られた各直鎖状プラスミドDNAは、それぞれ1mgをcRNAプローブ合成に使用し、DIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics、Switzerland)を用いて反応混合液(プラスミドDNA、1 x DIG RNA labeling Mix、1 x Transcription buffer、1 U/ml RNasin、2 U/ml T7又はSP6 RNA polymerase、RNase-free dH<sub>2</sub>O)は全量20mlとした。この反応液を37°Cで2時間反応させ、DNaseを用いてプラスミドDNAを分解し、0.5 M EDTA 1 mlで反応を停止した。合成されたcRNAプローブをエタノール沈殿し、遠心(15000rpm、4°Cにて15分間)によって得られたペレットを乾燥させた後、アルカリ加水分解液(40mM NaHCO<sub>3</sub>、60mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH 10.2)に溶解し、60°Cにて9分間、断片化処理を行った。処理後再びエタノール沈殿を行い、沈殿物をDEPC水(Milli-Q水を0.1% DEPCで一晩処理し、オートクレーブにて121°C、40分間加熱して無毒化したもの)に溶解した。

##### [0051] (2) インサイツ(in situ)ハイブリダイゼーション



4% Paraform aldehydeにて固定を行ったマウス結腸の凍結試料を、クリオスタット(LEICA CM1800; Leica)を用いて厚さ20mmの切片を作成し、4×SSC (0.6 M NaCl, 0.6M Sodium Citrate)に浮かべた。得られた切片をPBSで洗浄し、1 mg/ml Proteinase K(0.1 M Tris-HCl pH 8.0/50 mM EDTA希釈)で37℃、20分間処理した。4% Paraform aldehydeを用いて10分間後固定し、PBSで洗浄した。0.25% 無水酢酸(0.1 M Triethanolamin希釈)で10分間室温にて静置、再びPBSで洗浄した。そしてhybridization buffer (50% formamide、10 mM Tris-HCl pH 7.6、1 x Denhardt Solution、0.2 mg/ml Yeast tRNA、10% Dextran Sulfate、600 mM NaCl、0.25% SDS、0.5 M EDTA pH 8.0)にプローブを200 ng/mlの濃度になるように加え、60℃で一晩(約16時間)反応させた。ハイブリダイゼーション反応後、2 x SSC/50% formamideで60℃、30分間プローブの洗浄を行い、TNE (10 mM Tris-HCl pH 7.6、500 mM NaCl、1 mM EDTA)に10分間置換した後、20 mg/ml RNase(TNE希釈)で過剰プローブを分解した。TNEにて10分洗浄した後、2 x SSC、1 x SSC、0.5 x SSCで20分間の洗浄を55℃で行った。シグナル検出のため、TBS (100 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl)に5分間置換し、1.5% Blocking Reagent(TBS希釈)で37℃1時間、DIG抗体のブロッキング反応を行った。TBSで5分間洗浄し、ヒツジ抗DIG抗体(Roche Diagnostics、Switzerland)、1:500(1.5% Blocking Reagent希釈)をもちいて、室温1時間にて抗体反応を行った。TBST(100 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、0.1% Tween 20)で洗浄して抗体を除去し、NTM (100 mM Tris-HCl pH9.5、100 mM NaCl、50 mM MgCl<sub>2</sub>)に3分間置換した。そして、0.34 mg/ml NBT、0.18% BCIP (NTM希釈)にて検鏡しながら発色を行い、反応停止液(10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA pH 8.0)にて10分処理し、発色反応を停止させた。発色後、切片はPBS中でスライドグラスにのせ、90% glycerol(PBS希釈)で封入し、光学顕微鏡で検鏡した。

#### 実施例 5

[0052] 安定発現細胞の作製

目的の遺伝子DNAが挿入されたベクターを得るためにpEGFP-N3 (Invitrogen社)のEGFPを制限酵素KpnI、NotI(Takara社)を用いて切り出し、TaKaRa Ligation Kit ver.2 (Takara社)を用いてG16の配列を挿入した。さらにマウスGT01の配列を制限酵素、KpnI (Takara社)、TaKaRa Ligation Kit ver.2 (Takara社)を用いてG16の上流側に挿入した。

細胞へのDNA導入はエレクトロポレーション法を用いた。細胞(HEK-293 (ヒト胎児腎臓由来)、2, 500, 000個)を培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose, GIBCO社)に懸濁し、DNA溶液(DNA量は10-15  $\mu$ g)を加えて10分間静置した後、Bio Rad Capacitance Pulse Controller Gene Pulser を用いて240V、975- $\mu$ Fの条件で導入した。

受容体DNAを導入した細胞は薬剤入り培地(G418:1.0mg/mL、ペニシリン:100unit/mL、ストレプトマイシン:100  $\mu$ g/mL、10%FCS)を用いて37°C 5%CO<sub>2</sub>で培養し、セレクションを行った。10日後、コロニーをピックアップし、薬剤入り培地(G418 0.5mg/mL、ペニシリン:100unit/mL、ストレプトマイシン:100  $\mu$ g/mL、10%FCS)で培養した。

## 実施例 6

### [0053] レセプター(GT01ポリペプチド)の細胞内移行を用いた計測

#### (1) アッセイ用プレートのE-C-Lコーティング

##### E-C-L Cell

Attachment Matrix (Upstate社)を5  $\mu$ g/mL含む無菌PBS(137mM NaCl、8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、2.68mM KCl、1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)をViewPlate-96 (Packard社)に各穴100  $\mu$ Lとなるように加え、37°Cで1時間または4°Cで一晩培養し、これを以下のアッセイに用いた。

#### (2) 細胞のプレートへの播種

キメラ受容体安定発現細胞(HEK細胞)をトリプシンで細胞を剥がし、10%FCS入り培地に懸濁させた。E-C-Lコーティングしたプレートに各穴の液量が100  $\mu$ Lで、かつ細胞数が $5 \times 10^4$ となるように細胞をまいて、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で一晩培養した後、培地を除き、無血清培地を各穴100  $\mu$ Lに加えた。

### (3) アゴニスト(又はアンタゴニスト)のアッセイ

細胞に発現しているキメラ受容体のアゴニスト(又はアンタゴニスト)と推定される脂質を各穴1  $\mu$ Lとなるように加え、37°C、5%  $\text{CO}_2$  条件下で1時間培養した。

#### <細胞の固定・染色>

培養後、培地を除き、固定染色液(10  $\mu$ g/mL Hoechst No. 33342(SIGMA社)、2%パラホルムアルデヒド(ナカライ社)を含有)を各穴100  $\mu$ L加えた後、暗所で30分静置した。

このプレートの穴を完全に覆うようにELISA TAPE(IWAKI社)を貼った。

### [0054] (4) アッセイ

解析には、Cellomics社製ArrayScan Systemを使用した。核をHoechstにより染色し、また受容体にGFPを結合させキメラ受容体とすることによって、薬物処理に伴う受容体の挙動をGFPの挙動として追跡した。細胞膜上にある局在するGタンパク質共役型受容体はリガンド刺激により、細胞質内へと内在化するものがあることが知られている。核から一定距離にあるキメラ受容体を内在化したものとして判定し、受容体の内在化が起こった細胞数の全細胞数に占める割合を各穴ごとに算出した。この算出された値をもとに、使用した脂質がマウスGT01レセプターのアゴニスト(又はアンタゴニスト)であるかを判定した(図3)。

### 実施例 7

### [0055] 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の測定

#### (1) FLIPRによる測定

細胞内カルシウム濃度の測定は次のように行った。目的の受容体を安定発現させた細胞(HEK細胞;1ウェル当たり200,000個)を96穴プレート(Collagen・Cell ware 96-well Black / Clear Plate, Becton dickinson)上で20時間、37°C、5% $\text{CO}_2$ の条件で培養した。バッファー(HEPES/Hanks、pH7.4)で希釈したFLIPR Calcium Assay Kit(Molecular Devices)を加え、1時間、37°C、5% $\text{CO}_2$ で培養した。バッファー(同上)で希釈した試験薬(各種遊離脂肪酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカノイン酸、オクタン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、マルガリン酸、パルミトレイン酸、エイコサトリエノイン酸、エライジン酸、ペトロセリニ

ン酸、オレイン酸、 $\alpha$ リノレン酸、 $\gamma$ リノレン酸、ホモ $\gamma$ リノレン酸、アラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノール酸、エイコサテトラエン酸、バクセン酸などを含む)を加え、FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices)を用いて488nmの励起光に対する510-570nmの蛍光強度を測定した(図4)。図5に種々の遊離脂肪酸を加えた場合のHEK細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇における $\text{pEC}_{50}$ を示す。図5のデータに示される脂肪酸は、ミリスチン酸(C14:0)、ペンタデカノイン酸(C15:0)、パルミチン酸(C16:0)、パルミトレイン酸(C16:1)、マルガリン酸(C17:0)、ステアリン酸(C18:0)、オレイン酸(C18:1)、 $\alpha$ リノレン酸(C18:3)、エイコサジエン酸(C20:2)、エイコサトリエン酸(C20:3)、エイコサテトラエン酸(C20:4)である。その他、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、なども同等の $\text{pEC}_{50}$ を示した。

[0056] (2) CAFによる測定

目的の受容体を安定発現させた細胞(2, 500, 000個)を5mLバッファー(135mM NaCl, 5mM KCl, 10mM グルコース, 10mM HEPES, 1.2mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ )で懸濁し、fura2-AM 15  $\mu$ Lを加えた後、37°C、40分、浸透培養した。その後試験薬を加え、CAF-110 (Jasco)を用いて340nm, 380nmの二励起光に対する500nmの蛍光強度比を測定した。

(2)-1. 顕微鏡下での測定

カバーガラスを底面に貼った35mm培養デッシュで、細胞(STC-1細胞)を培養する。Ca-tyrode溶液で洗浄後、2  $\mu$ M fura2-AMを含むCa-tyrode溶液を加え室温で20分間おく。Ca-tyrode溶液で2回洗浄後、1mLのCa-tyrode溶液を加え、室温で、ARGUS200 (340/380nm計測)対物レンズ40X 15sec間隔で画像の取り込みを行う。取り込んだ画像のそれぞれについてratioを計測する。10分後20分後にそれぞれ、リガンドと対照となる刺激(ボンベシン)を行う。

RNAiベクター導入時には、同時に導入したGFPによる蛍光を測定し、GFP蛍光があり、かつ、対照での $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が認められる細胞についての経時的な $\text{Ca}^{2+}$ 反応を定量し、表示した(図6)。ここで用いた脂肪酸は、 $\alpha$ リノレン酸(C18:3)である。

(2)-2. RNAiベクターの作製と導入



Ambion社製pSilencer2.1-U6systemを用いた。添付の方法に従って、目的遺伝子から選択したオリゴを合成、アニーリングした後上記のベクターにライゲーションした。得られたコンストラクトはシーケンスにて確認した。

STC-1細胞への遺伝子導入はLipofectamine plusを用いて行ったのち、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ を顕微鏡下で測定した(図6下図)。結果は、GT01に対して特異的なRNAiを行うと、 $\alpha$ リノレン酸の添加により観察されたカルシウム濃度上昇のピーク(図6上図)が消失した(図6下図)。従って、 $\alpha$ リノレン酸はGT01を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させていることが分かった。

### 実施例 8

#### [0057] CCKの測定(特願2003-180375明細書参照)

STC-1細胞は24穴プレートに $8 \times 10^4$  and  $1 \times 10^5$  cellscm<sup>-2</sup>で培養した。24-48時間後にcholecystokinin octapeptide (26-33, Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>)の定量を行った。細胞は、3回ハanks緩衝液(HBBS)で洗浄後0.5mLのハanks中、各種遊離脂肪酸の薬物と濃度で37°C60分間反応させた。培養上清を回収し、5分間遠心して(約5000 g)細胞片を除き、上清について、CCK(26-33)特異的なEIA法のキット(Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA)を用いて測定した(図7)。ここでは、リノレン酸(C18:3)、オレイン酸(C18:1)、ステアリン酸(C18:0)、ペラルゴン酸(C9:0)を用いた。

### 実施例 9

#### [0058] GLP-1の測定

STC-1細胞は24穴プレートに $8 \times 10^4$ および $1 \times 10^5$ 細胞cm<sup>-2</sup>で培養した。24-48時間後にGLP-1の定量を行った。細胞は、3回ハanks緩衝液(HBBS)で洗浄後0.5mLのハanks中、各種遊離脂肪酸(10、30、100  $\mu$ M)で37°C60分間反応させた。培養上清を回収し、5分間遠心して(約5,000g)細胞片を除き、上清について、GLP-1特異的なEIA法のキット(Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA)を用いて測定した(図8)。ここでは、 $\alpha$ リノレン酸、ドコサヘキサエン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、ステアリン酸、オクタン酸、および $\alpha$ リノレン酸メチルエステルを用いた(図8)。

## 実施例 10

[0059] インサイツ(in situ)ハイブリダイゼーション

## (1) cRNAプローブの作成

マウスおよびヒトGT01、並びにマウスおよびヒトGLP-1の配列から、インビトロランスク립ション法により標識プローブの作製を行った。ジゴキシゲニンの標識には、DIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics, Switzerland)を使用し、反応混合液(プラスミドDNA、1xDIG RNA labeling Mix、1x Transcription buffer、1U/ml RNasin、2U/ml T7又はSP6RNA polymerase、RNase-free dH<sub>2</sub>O)は全量20mlとして行った。この反応液を37℃で2時間反応させ、DNaseを用いてプラスミドDNAを分解し、0.5MEDTA 1mlで反応を停止した。合成されたcRNAプローブをエタノール沈殿し、遠心(15000rpm、4℃にて15分間)によって得られたペレットを乾燥させた後、アルカリ加水分解液(40mMNaHCO<sub>3</sub>、60mMNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH10.2)に溶解し、60℃にて9分間、断片化処理を行った。処理後再びエタノール沈殿を行い、沈殿物をDEPC水(Milli-Q水を0.1% DEPCで一晩処理し、オートクレーブにて121℃、40分間加熱して無毒化したもの)に溶解した。

## [0060] (2) インサイツ(in situ)ハイブリダイゼーション

マウス(C57BL/6, オス、8週齢)結腸を固定液(Genostaff社)で灌流固定したのち結腸を採取し、再度、同じ固定液による固定を行いパラフィン包埋ブロックを作製した。得られたパラフィン包埋ブロックから4μmの切片を作成したのち、GT01およびGLP-1のプローブを用いてインサイツハイブリダイゼーションを行った。染色は、Genostaff社の方法に基づいて行った。ハイブリダイゼーション反応後、プローブの洗浄を行い、TNE(10mMTris-HClpH 7.6、500mMNaCl、1mMEDTA)に10分間置換した後、20mg/ml RNase(TNE希釈)で過剰プローブを分解した。TNEにて10分洗浄した後、2xSSC、1xSSC、0.5xSSCで20分間の洗浄を55℃で行った。シグナル検出のため、TBS(100 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl)に5分間置換し、1.5% Blocking Reagent(TBS希釈)で37℃1時間、DIG抗体のブロッキング反応を行った。TBSで5分間洗浄し、ヒツジ抗DIG抗体(Roche Diagnostics, Switzerland)、1:500(1.5% Blocking Reagent希釈)をもち

いて、室温1時間にて抗体反応を行った。TBST(100mMTris-HClpH7.5、150mMNaCl、0.1%Tween20)で洗浄して抗体を除去し、NTM(100mMTris-HClpH9.5、100mMNaCl、50mM  $MgCl_2$ )に3分間置換した。そして、0.34mg/ml NBT、0.18% BCIP (NTM希釈)にて検鏡しながら発色を行い、反応停止液(10mM Tris-HCl、1 mM EDTA pH 8.0)にて10分処理し、発色反応を停止させた。発色後、切片はPBS中でスライドグラスにのせ、90% グリセロール(PBS希釈)で封入し、光学顕微鏡で検鏡した(図9)。

上記と同様の方法を用いて、ヒト結腸サンプルについても観察を行なった(図10)。観察の結果、GT01とGLP-1の発現部位がほぼ一致していることが分かった。

### 実施例 11

#### [0061] in vivoにおけるGT01に対するリガンドのGLP-1放出への影響

in vivoにおけるGLP-1の放出に対する、GT01のリガンド(遊離脂肪酸)の影響を検討した。

100nmol $g^{-1}$ 量の脂肪酸( $\alpha$ リノレン酸、ステアリン酸、オクタン酸)を担体としてポリエチレングリコールに包含させ、24時間断食後のオスの8週齢C57/B6マウス(Sankyo Lab)に対し、チューブを介して胃に直接与えた。脂肪酸の投与後、0.5時間、または2時間後にジエチルエーテルで麻酔したのち、ヘパライズしたシリンジを用いて門脈より血液を採取した。血漿は、ヘパリン化された血液を、4°C、20分、1,200xgで遠心することで調製し、GLP-1の酵素免疫アッセイ(矢内原研究所)を行った。全ての実験は施設の認可されたガイドラインに従って行った。その結果、特に、 $\alpha$ リノレン酸、ステアリン酸を与えた場合に、GLP-1の分泌が顕著であった(図11)。

また、同様の方法により、門脈と下大静脈より採取した血漿中のGLP-1濃度の測定を行なった(図12)。

### 実施例 12

#### [0062] in vivoにおけるGT01に対するリガンドのインスリン放出への影響

in vivoにおけるインスリンの放出に対する、GT01のリガンド(遊離脂肪酸)の影響を検討した。

100nmolg<sup>-1</sup>量の脂肪酸(αリノレン酸)を担体としてポリエチレングリコールに包含させ、24時間断食後のオスの8週齢C57/B6マウス(Sankyo Lab)に対し、チューブを介して胃に直接与えた。脂肪酸の投与後、2時間ジエチルエーテルで麻酔したのち、ヘパリナイズしたシリンジを用いて門脈より血液を採取した。血漿は、ヘパリン化された血液を、4℃、20分、1, 200xgで遠心することで調製し、インスリンの酵素免役アッセイキット(MORINAGA)を用いてインスリンの定量を行った。全ての実験は施設の認可されたガイドラインに従って行った。その結果、門脈から採取した血漿中に下大静脈血漿よりも高い濃度のインスリンの分泌が検出された(図13)。

[0063] 参考文献

Anderson等, Science 256:808-813, 1992

Ausubel等, Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York. 1987

Beardshall等, Lancet ii 1008-1010, 1989

Brynes, A.E., Am J Clin Nutr 72:1111-1118, 2000

Chen及びOkayama, BioTechniques. 6:632-638, 1988

Cohen等, Oligodeoxynucleotides:Antisense inhibitors of gene expression. CRC Press, Boca Raton, FL. 255 pp. 1989

Drucker, Diabetes 47:159-169 1998

Drucker, Endocrinology 142:521-527, 2001

Elroy-Stein及びMoss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6743-6747, 1990

Eppstein等, Proc Natl Acad Sci USA. 82:3688-92, 1985

Fredriksson等, FEBS 554:381-388, 2003

Flint等, J Clin Invest 101:515-520 1998

Gennaro等: The science and practice of pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2000

Guimbaud等, Pancreas 14:76-82, 1997

Goding等, Academic Press, San Diego. 492 pp. 1996



- Harlow及びLane, Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 pp, 1988
- Harlow及びLane, Using antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1999
- Cuche, G.等, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 279:G925-930, 2000
- Higham等, Gut 41:24-32, 1997
- Hopman等, Gastroenterology 89:1242-1247, 1985
- Hwang等, Proc Natl Acad Sci USA. 77:4030-4, 1980
- Isaacs等, Digestive Diseases and Sciences 32:451-480, 1987
- Jones等, Nature. 321:522-5, 1986
- Kozbor等, J Immunol. 133:3001-5, 1984
- Liddle, Annual Review of Physiol  
59:221-242, 1997
- Liddle等, Journal of Clinical Investigation 72:992-996, 1986
- Lopata等, Nucleic Acids Research. 12:5707. 1984
- Martin及びPapahadjopoulos, J Biol Chem. 257:286-8, 1982
- Milstein等, Nature. 305:537-40, 1983
- Morrison等, Genetically engineered antibody molecules and their application.  
Ann NY Acad Sci. 507:187-98, 1987
- Okano等, J Neurochem. 56:560-7, 1991
- Presta等, Curr Opin Biotechnol. 3:394-8, 1992
- Reimer R.A.等, Endocrinology 142:4522-4528, 2001
- Riechmann等, Nature. 332:323-7, 1988
- Rocca, A.S.等, Endocrinology 142:1148-1155, 2001
- Sambrook, J. Molecular cloning: a  
laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 1989
- Schade等, The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and  
recommendations of ECVAM workshop. Alternatives to Laboratory Animals

(ATLA).

24:925-934, 1996

Sidhu等, J. Physiol. 528.1:165-176, 2000

Smith及びGibbs, J. Annals of the New York Academy of Science 713:236-241, 1994.

Thorens及びWaeber

Diabetes 42:1219-1225, 1993

Tonkinson等, Cancer Investigation, 14(1): 54-65, 1996

Turton等, Nature 379:69-72 1996

Verhoeyen等, Science. 239:1534-6, 1988

### 産業上の利用可能性

- [0064] 本発明は、糖尿病などにおける上昇した血糖値の低下およびその上昇の予防のための製剤の開発に役立つ。特に、肥満症状が著しい患者の治療に適した製剤の開発も可能となる。

### 図面の簡単な説明

- [0065] [図1]図1は、7回膜貫通型受容体の模式図を示す。
- [図2]図2は、マウスGT01遺伝子発現の組織特異性を示したものである。GAPDH(グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素)は、発現比較のコントロールとして用いた。
- [図3]図3は、GT01ポリペプチドにリガンドが結合した結果、該ポリペプチドがリガンドと共に細胞内へ移行していく様子を示す蛍光顕微鏡像を示す。
- [図4]図4は、遊離脂肪酸によって誘導された細胞内カルシウム濃度の上昇を、FLIP R(Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices)を用いて488nmの励起光に対する510-570 nmの蛍光強度を検出することにより測定した結果を示す。
- [図5]図5は、種々の遊離脂肪酸を加えた場合のHEK細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇における $\text{pEC}_{50}$ を示す。
- [図6]図6は、 $\alpha$ リノレン酸によって誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇に対するヒトGT01のアンチセンスの影響を示す。
- [図7]図7は、各種遊離脂肪酸によって誘導されるCCK放出の遊離脂肪酸濃度依存

性を示す。

[図8]図8は、各種脂肪酸( $\alpha$ リノレン酸( $\alpha$ -Linolenic acid)、ドコサヘキサエン酸(DHA)、パルミトレイン酸(Palmitolenic acid)、オレイン酸(Oleic acid)、ステアリン酸(Steric acid)、オクタン酸(Octanoic acid)、 $\alpha$ リノレン酸メチルエステル( $\alpha$ -Linolenic acid-methyl ester))によって誘導されるGLP-1放出量(縦軸)を示す。脂肪酸濃度は、 $10\mu\text{M}$ 、 $3\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ (横軸)で行った。

[図9]図9は、GT01およびGLP-1に関する、マウス結腸におけるインサイツハイブリダイゼーションの結果を示す。

[図10]図10は、GT01およびGLP-1に関する、ヒト結腸におけるインサイツハイブリダイゼーションの結果を示す。

[図11]マウスに各種脂肪酸( $\alpha$ リノレン酸( $\alpha$ -Linolenic acid)、ステアリン酸(Steric acid)、オクタン酸(Octanoic acid))を与えたことによる、マウス門脈(portal vein)中のGLP-1濃度の変動を示す。ネガティブコントロールとして、脂肪酸および担体を与えなかった場合(Control)、担体(Vehicle)のみを与えた場合について測定した。

[図12]マウスに $\alpha$ リノレン酸( $\alpha$ -LA)を与えた後、0.5時間(0.5hr)または2時間(2hr)後における、マウス門脈(portal vein)または下大静脈(inferior vena cava)中のGLP-1濃度を示す。ネガティブコントロールとして、脂肪酸および担体を与えなかった場合(Control)、担体(Vehicle)のみを与えた場合について測定した。

[図13]マウスに $\alpha$ リノレン酸( $\alpha$ -LA)を与えた後、0.5時間(0.5hr)または2時間(2hr)後における、マウス門脈(portal vein)または下大静脈(inferior vena cava)中のインスリン濃度を示す。ネガティブコントロールとして、脂肪酸および担体を与えなかった場合(Control)、担体(Vehicle)のみを与えた場合について測定した。

## 請求の範囲

- [1] 配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列からなり、細胞からのGLP-1の分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。
- [2] 配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、細胞からのGLP-1の分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。
- [3] 配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、細胞からのGLP-1の分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。
- [4] 前記GLP-1が、インスリンの分泌を誘導する請求項1乃至3のいずれか1項に記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。
- [5] 腸内分泌細胞表面上に存在する請求項1乃至4のいずれか1項に記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。
- [6] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- [7] 請求項6に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- [8] 請求項7に記載のベクターを有効成分として含んで成り、糖尿病に伴う高血糖値を低下させるための医薬組成物。
- [9] インスリンの分泌を誘導する請求項8に記載の医薬組成物。
- [10] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩のリガンド。
- [11] 直鎖または分岐の遊離脂肪酸である請求項10に記載のリガンド。
- [12] 前記遊離脂肪酸の炭素数が10〜24である請求項11に記載のリガンド。
- [13] 前記遊離脂肪酸の不飽和結合数が0〜6である請求項11または12に記載のリガンド。
- [14] 前記遊離脂肪酸が、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカノイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、マルガリン酸、パルミトレイン酸、エイコサトリエノイン酸、エライジン酸、ペトロセリニン酸、オレイン酸、 $\alpha$ リノレン酸、 $\gamma$ リノ



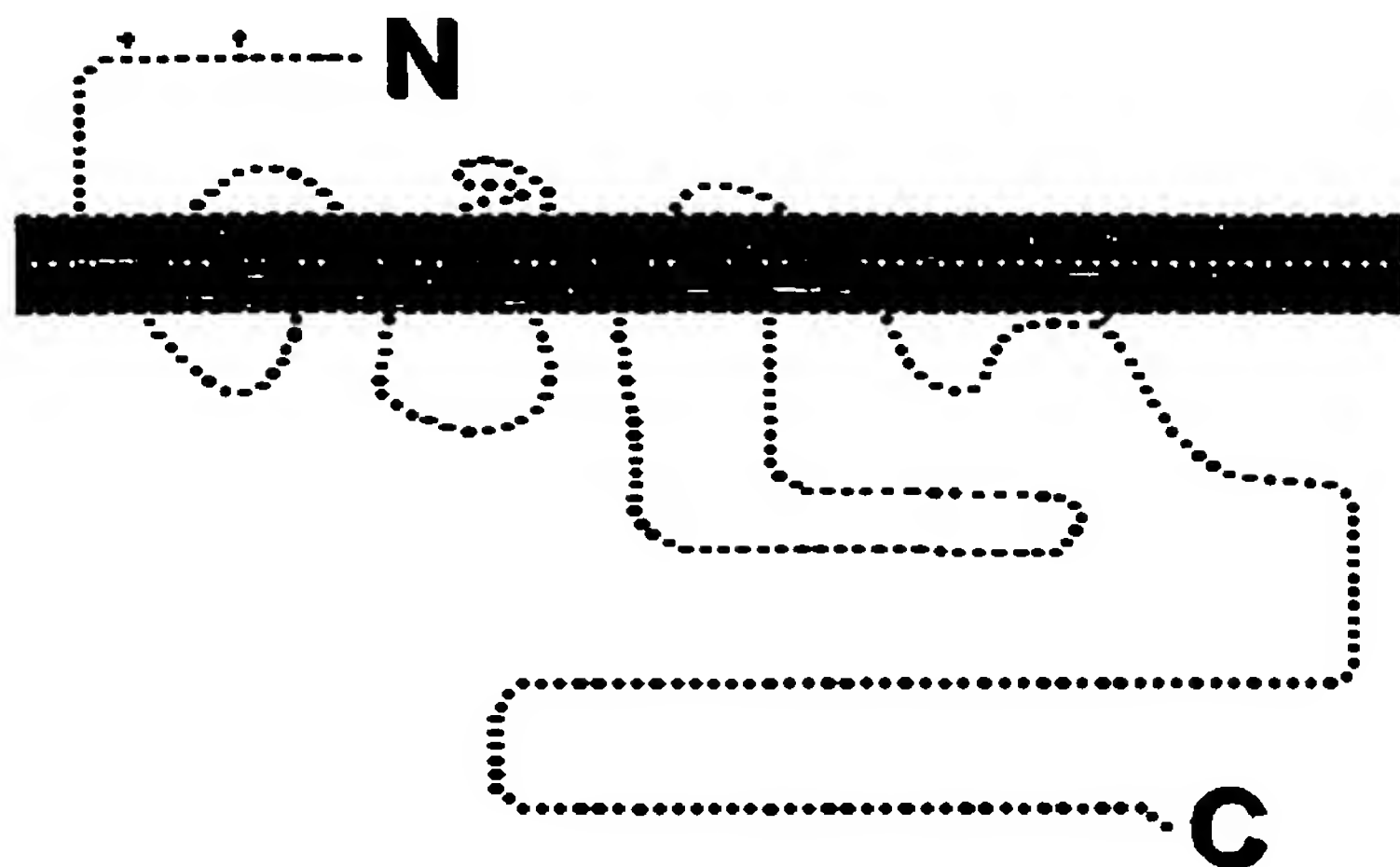
レン酸、ホモγリノレン酸、アラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノール酸、エイコサテトラエン酸、バクセン酸からなるグループから選択される請求項13に記載のリガンド。

- [15] 請求項10乃至14のいずれか1項に記載のリガンドを有効成分として含んで成り、糖尿病に伴う高血糖値を低下させるための医薬組成物。
- [16] インスリンの分泌を誘導する請求項15に記載の医薬組成物。
- [17] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載されたポリペプチドまたはその塩に対するリガンド候補物質の特異的結合能を調べる工程を含むことを特徴とする該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドの決定方法。
- [18] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載されたポリペプチドまたはその塩を使用することを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法。
- [19] 請求項1乃至5のいずれか1項に記載されたポリペプチドまたはその塩を構成要素として含むことを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング用キット。
- [20] 糖尿病であるかまたは糖尿病の発生の危険性がある対象に由来する試料中における、請求項1乃至5のいずれかに記載のポリペプチドまたはその塩を検出する方法であって、該ポリペプチドまたはその塩を特異的に認識する薬剤と該試料を接触させ、該ポリペプチドまたはその塩を検出することを特徴とする方法。
- [21] 前記薬剤が、請求項1乃至5のいずれかに記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に結合する抗体であることを特徴とする請求項20に記載の方法。
- [22] 前記薬剤を必須構成要素として含むことを特徴とする請求項20または21に記載の方法に用いられるキット。
- [23] 配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列からなり、細胞からのCCKの分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。
- [24] 配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、細胞からのCCKの分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。

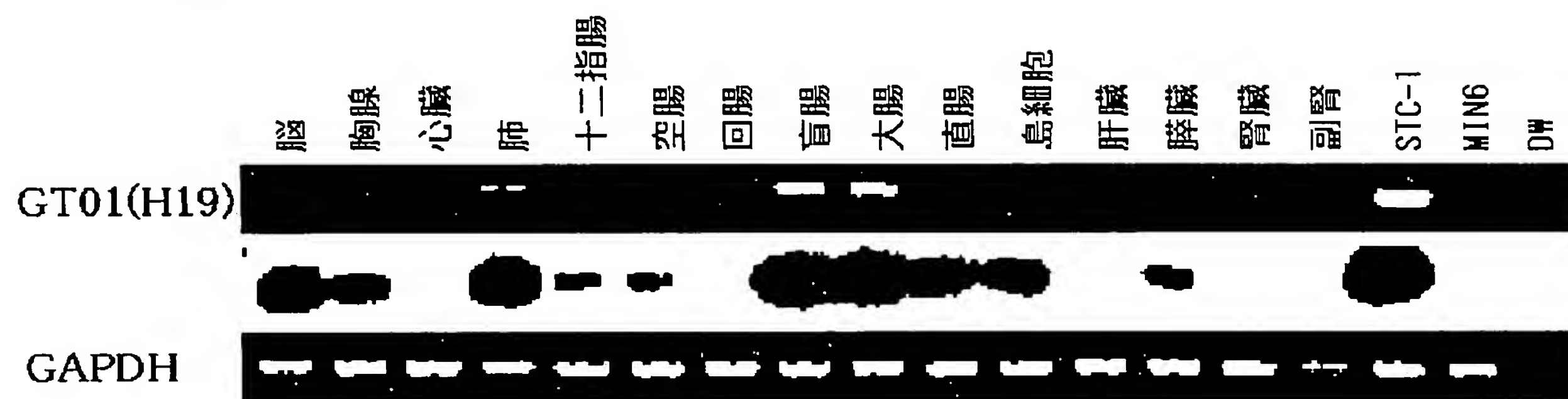
- [25] 配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、細胞からのCCKの分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。
- [26] 腸内分泌細胞表面上に存在する請求項23乃至25のいずれか1項に記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。
- [27] 請求項23乃至26のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
- [28] 請求項27に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- [29] 請求項28に記載のベクターを有効成分として含んで成り、摂食障害を治療するための医薬組成物。
- [30] 請求項23乃至26のいずれか1項に記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩のリガンド。
- [31] 直鎖または分岐の遊離脂肪酸である請求項30に記載のリガンド。
- [32] 前記遊離脂肪酸の炭素数が10〜24である請求31に記載のリガンド。
- [33] 前記遊離脂肪酸の不飽和結合数が0〜6である請求項31または32に記載のリガンド。
- [34] 前記遊離脂肪酸が、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカノイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、マルガリン酸、パルミトレイン酸、エイコサトリエン酸、エライジン酸、ペトロセリニン酸、オレイン酸、 $\alpha$ リノレン酸、 $\gamma$ リノレン酸、ホモ $\gamma$ リノレン酸、アラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノール酸、エイコサテトラエン酸、バクセン酸からなるグループから選択される請求項33に記載のリガンド。
- [35] 請求項30乃至34のいずれか1項に記載のリガンドを有効成分として含んで成り、摂食障害を治療するための医薬組成物。
- [36] 肥満症を治療するための請求項29又は35に記載の医薬組成物。
- [37] 拒食症を治療するための請求項29又は35に記載の医薬組成物。
- [38] 請求項30乃至34のいずれか1項に記載のリガンドを有効成分として含んでなる、栄養補助組成物。

- [39] 合理的なダイエットに用いられる請求項38に記載の栄養補助組成物。
- [40] 食欲不振の緩和に用いられる請求項38に記載の栄養補助組成物。
- [41] 請求項23乃至26のいずれか1項に記載されたポリペプチドまたはその塩に対するリガンド候補物質の特異的結合能を調べる工程を含むことを特徴とする該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドの決定方法。
- [42] 請求項23乃至26のいずれか1項に記載されたポリペプチドまたはその塩を使用することを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法。
- [43] 請求項23乃至26のいずれか1項に記載されたポリペプチドまたはその塩を構成要素として含むことを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング用キット。
- [44] 摂食障害であるかまたは摂食障害の発生の危険性がある対象に由来する試料中における、請求項23乃至26のいずれかに記載のポリペプチドまたはその塩を検出する方法であって、該ポリペプチドまたはその塩を特異的に認識する薬剤と該試料を接触させ、該ポリペプチドまたはその塩を検出することを特徴とする方法。
- [45] 前記薬剤が、請求項23乃至26のいずれかに記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に結合する抗体であることを特徴とする請求項44に記載の方法。
- [46] 前記薬剤を必須構成要素として含むことを特徴とする請求項44または45に記載の方法に用いられるキット。

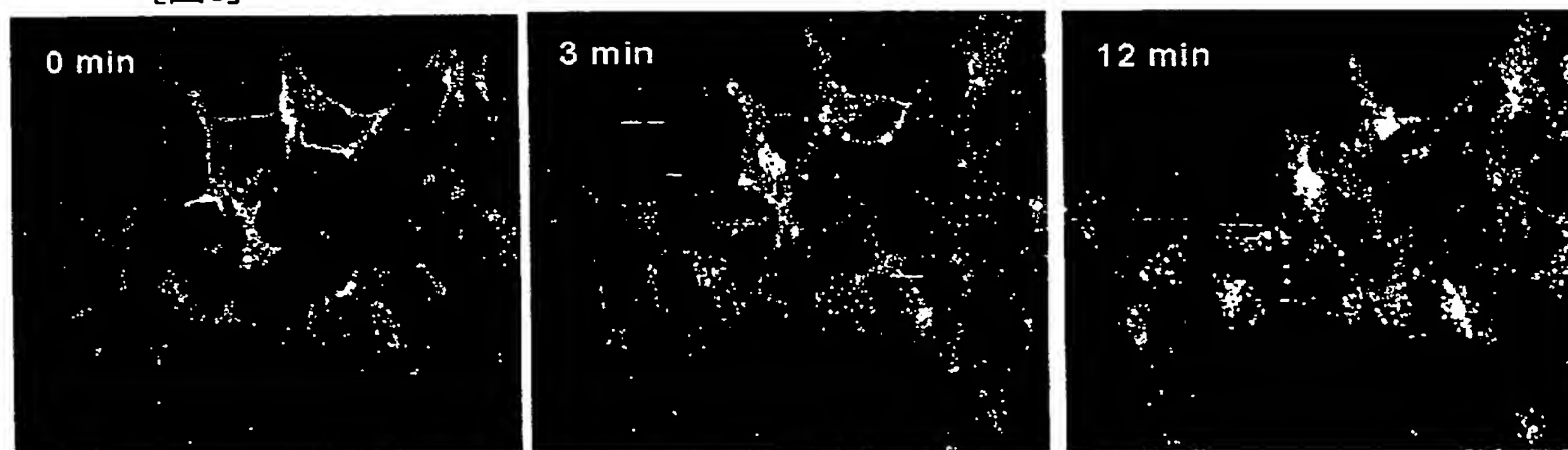
[図1]



[図2]



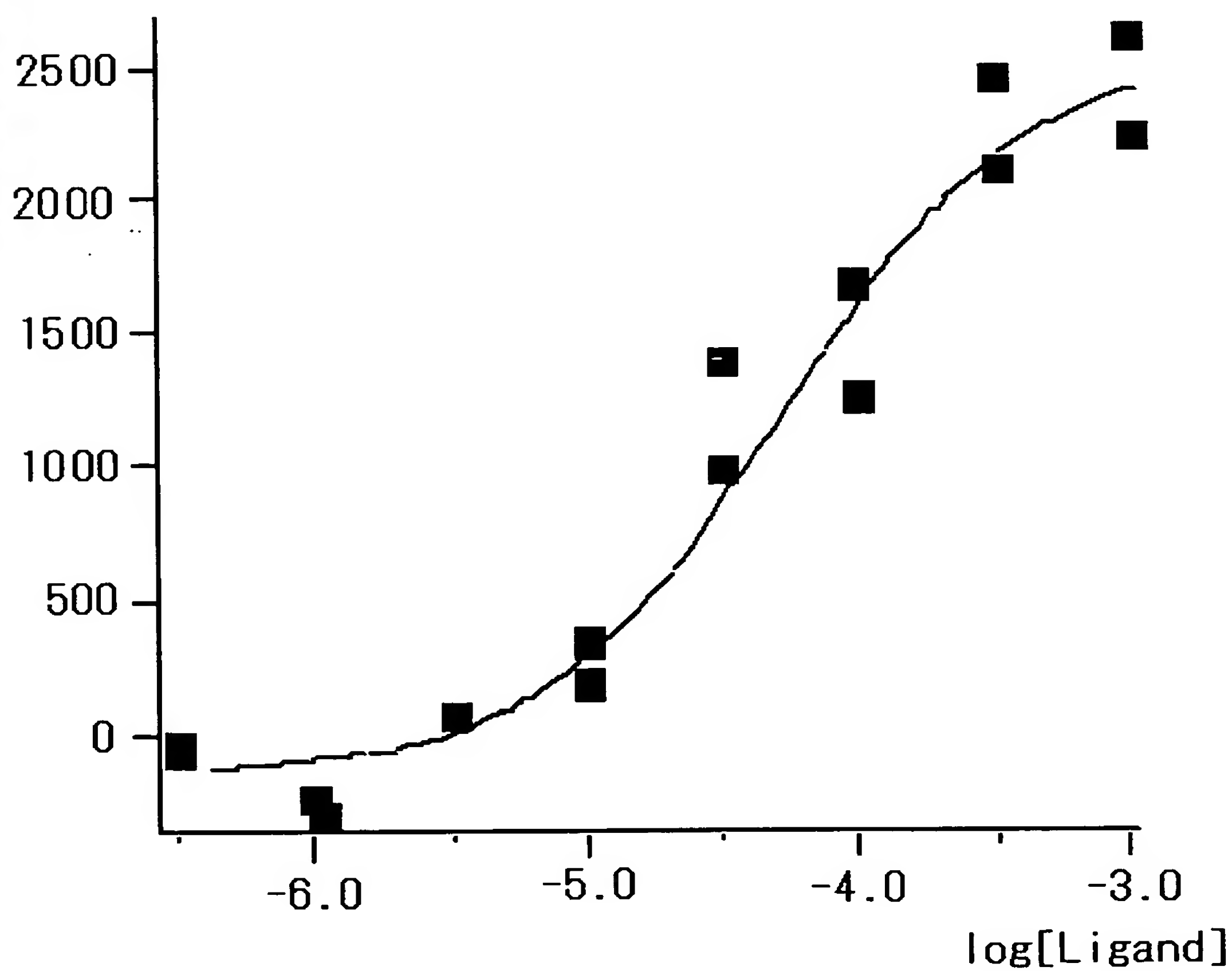
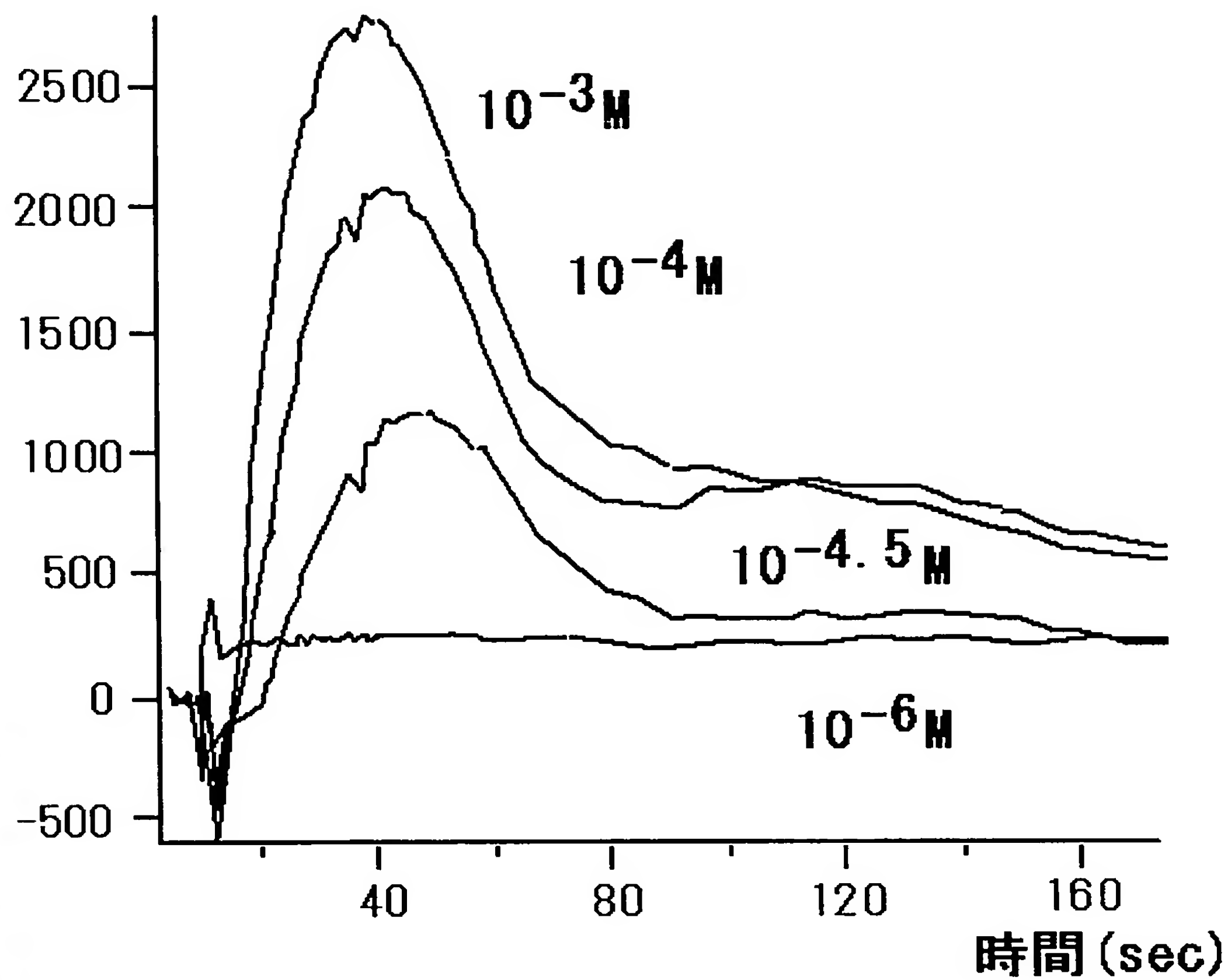
[図3]





[図4]

蛍光量の変化

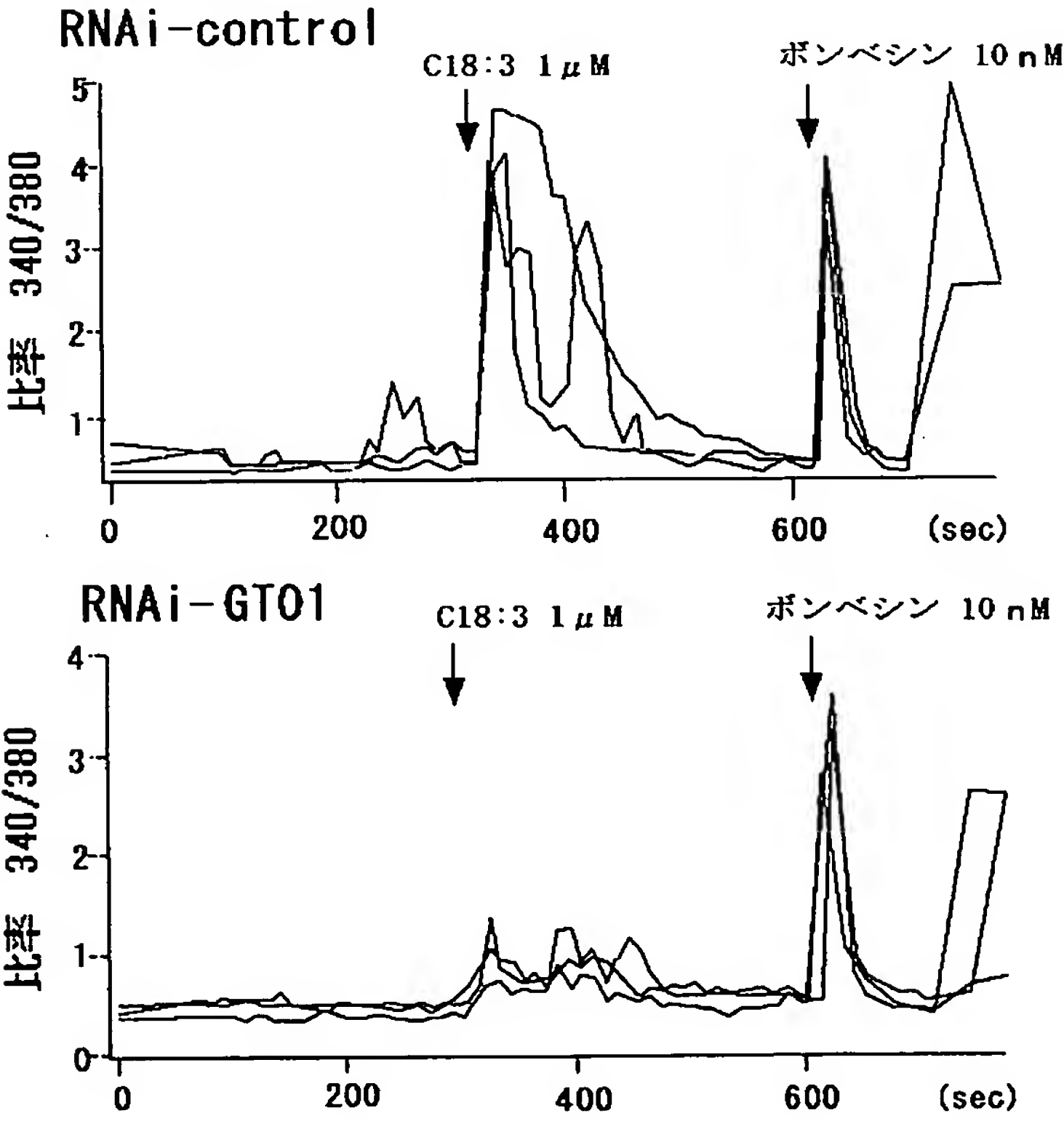


[図5]

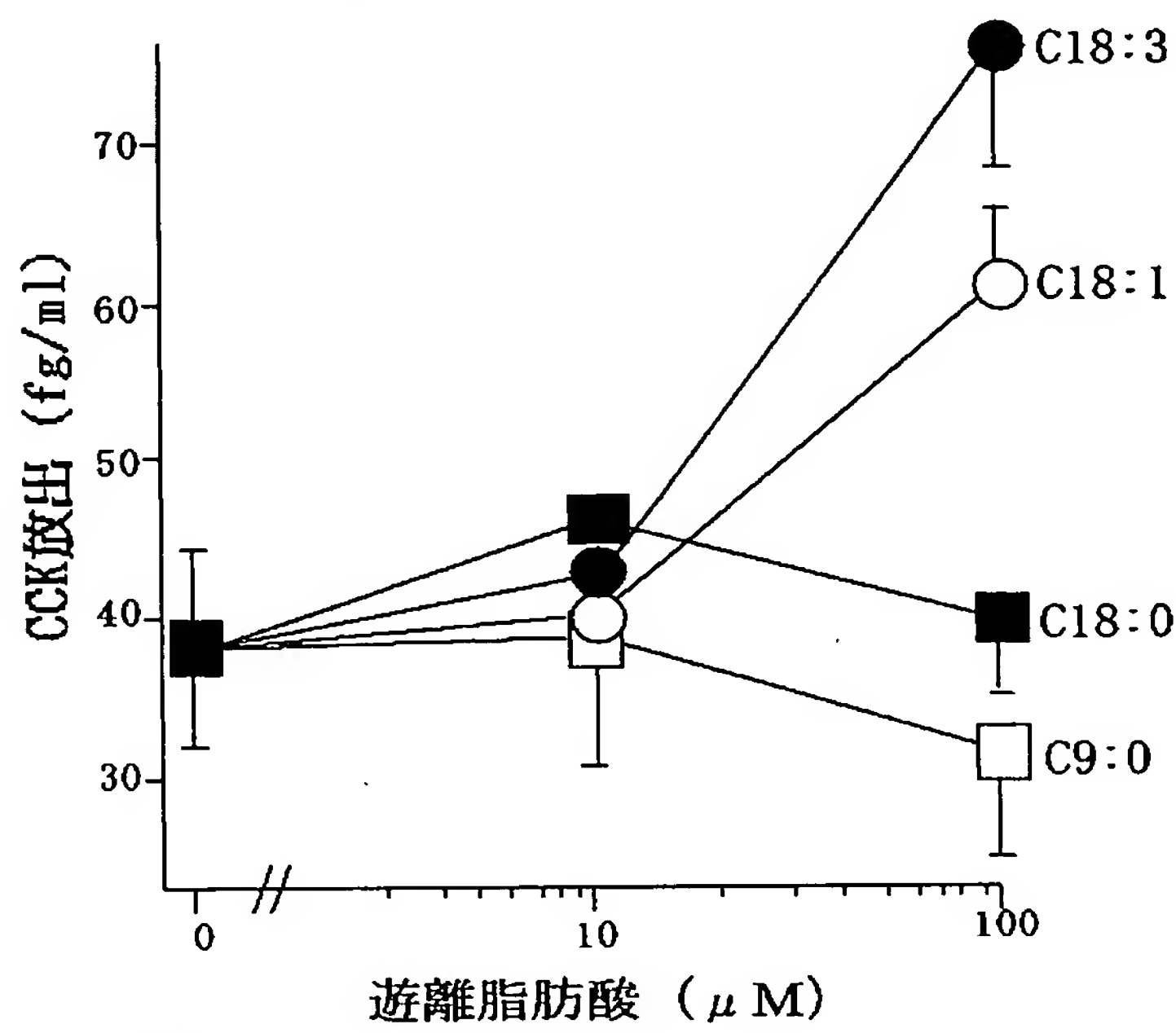
H19 (GT01)-G16 キメラを発現するHEK細胞中  
での $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を誘起する遊離脂肪酸の能力  
(pEC<sub>50</sub>)

不飽和 炭素数 \ 結合数	0	1	2	3	4
C8	—				
C9	—				
C10	—				
C11	—				
C12	—				
C14	4.4				
C15	4.3				
C16	4.2	5.1			
C17	4.4				
C18	4	4.5		6.3	
C20	—		4.6	4.8	5.5
C22	—				
C23	—				

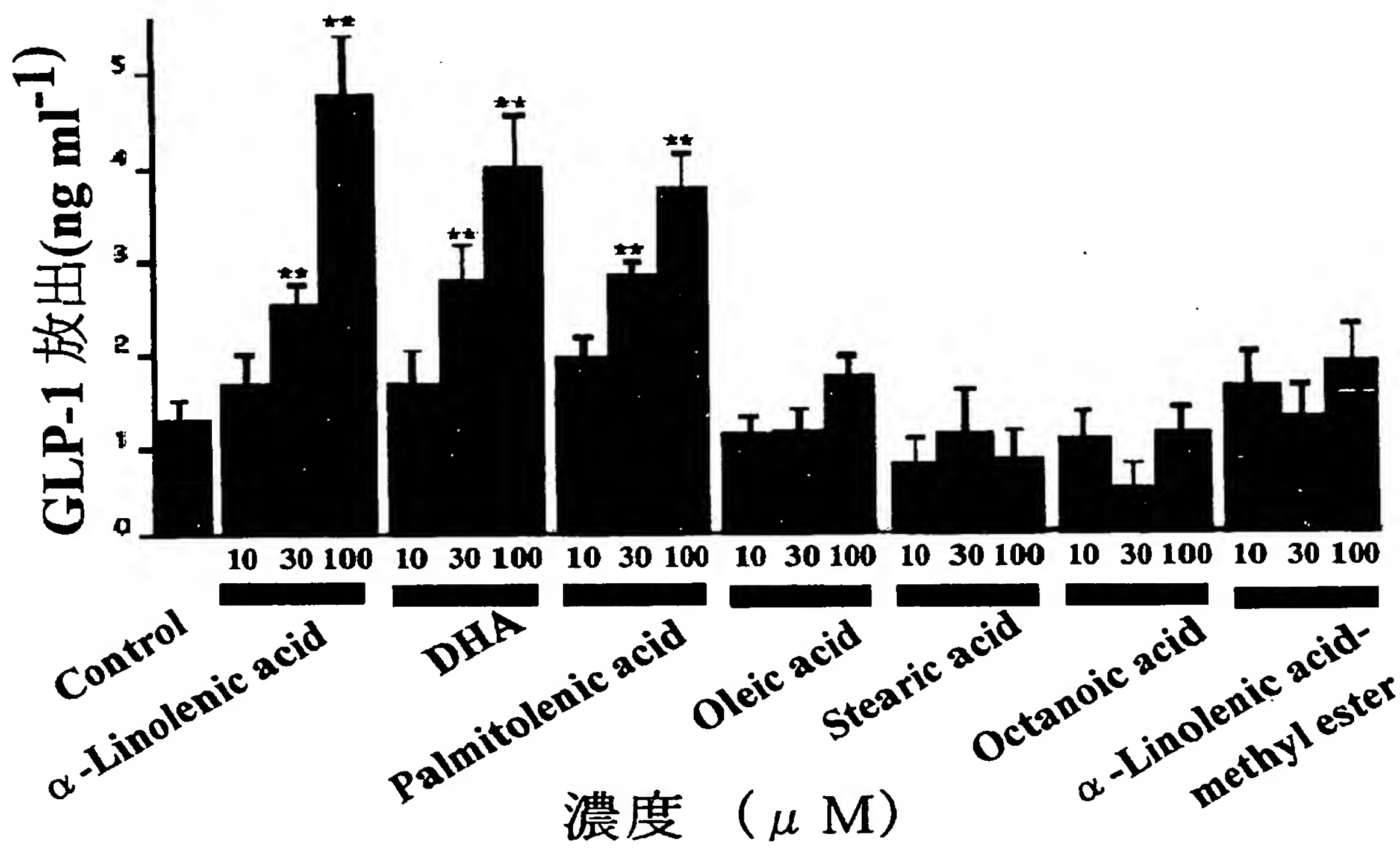
[図6]



[図7]  
STC-1 細胞中の遊離脂肪酸によって誘導されるCCK放出

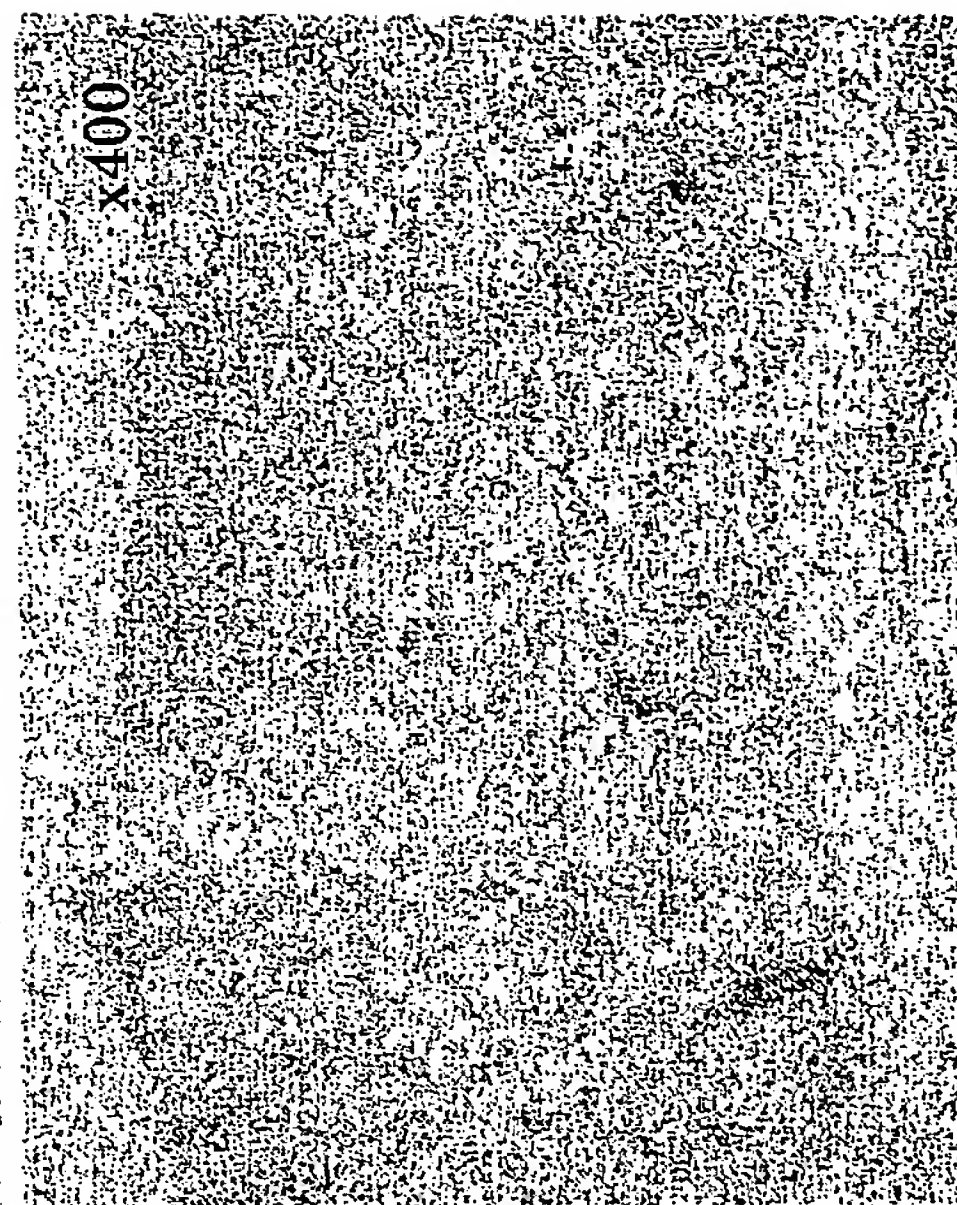
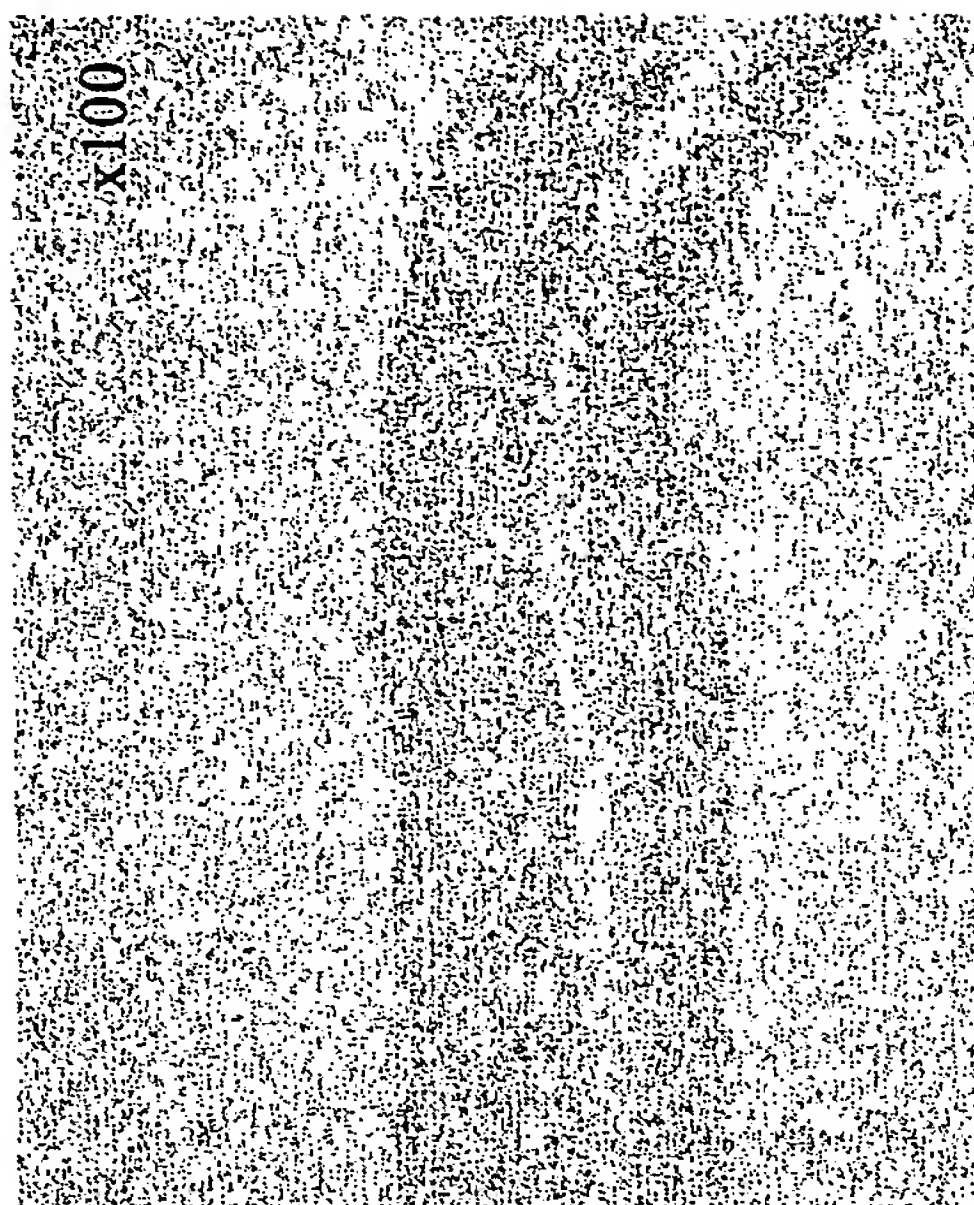


[図8]

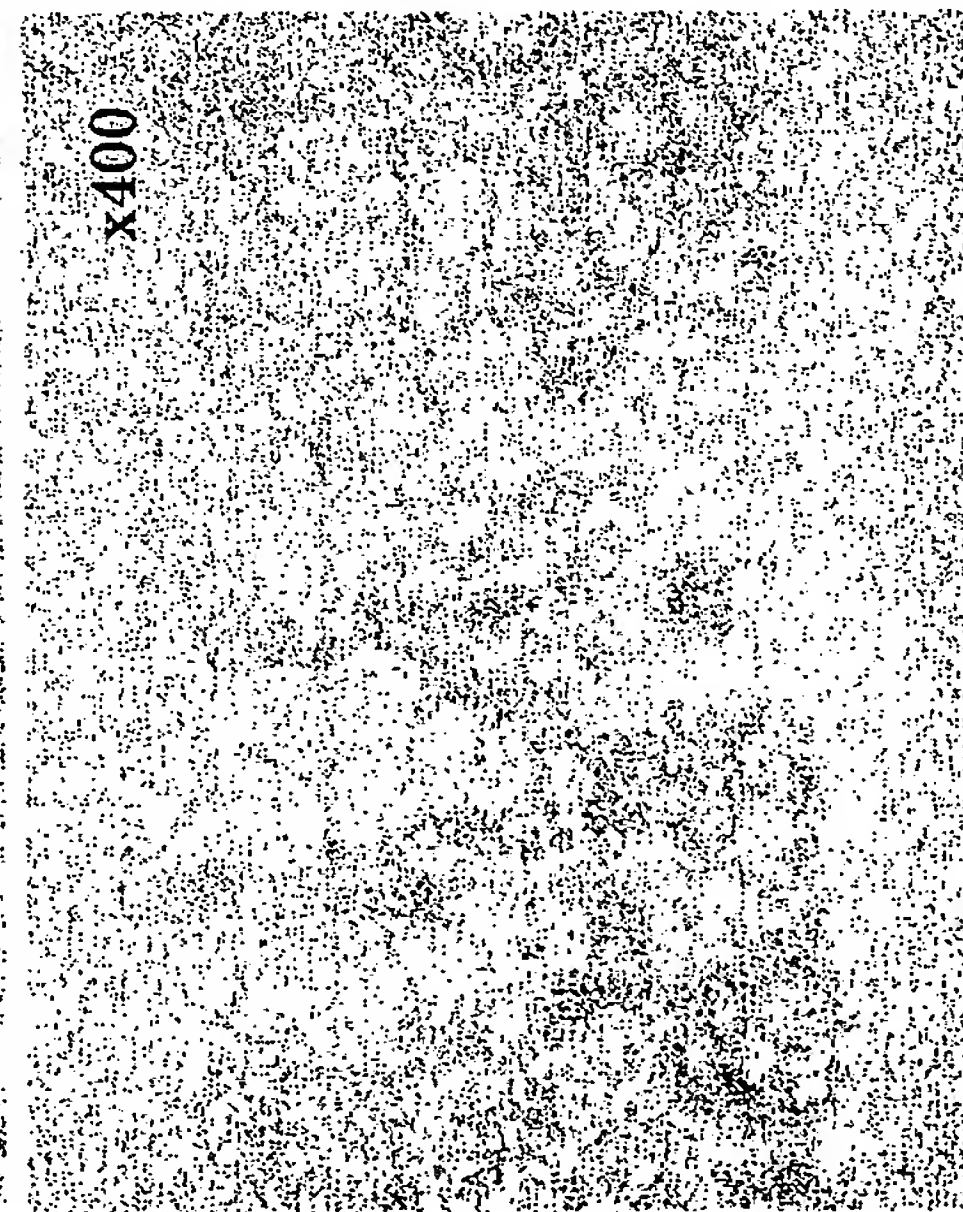
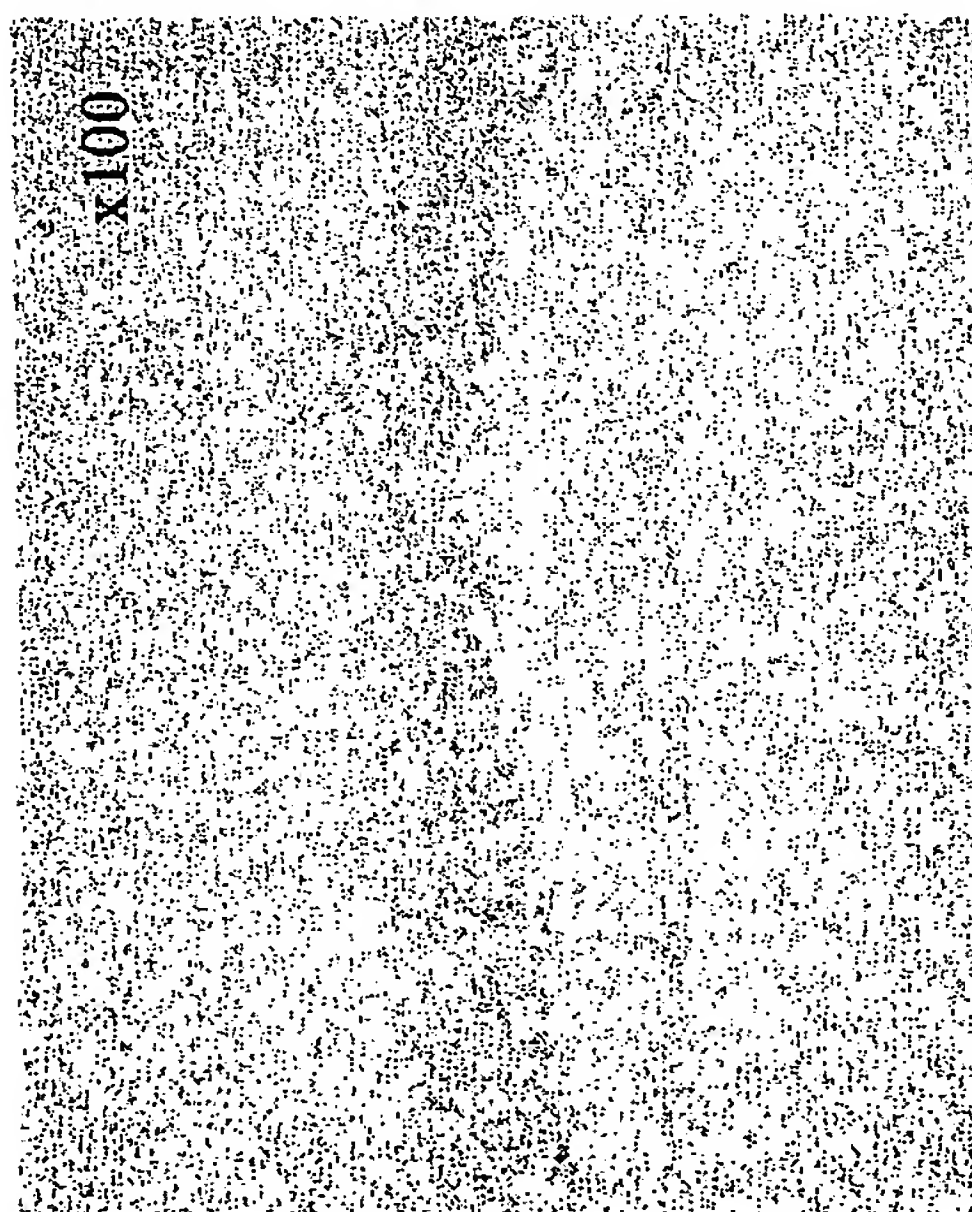


[図9]

GLP-1  
(IHC)

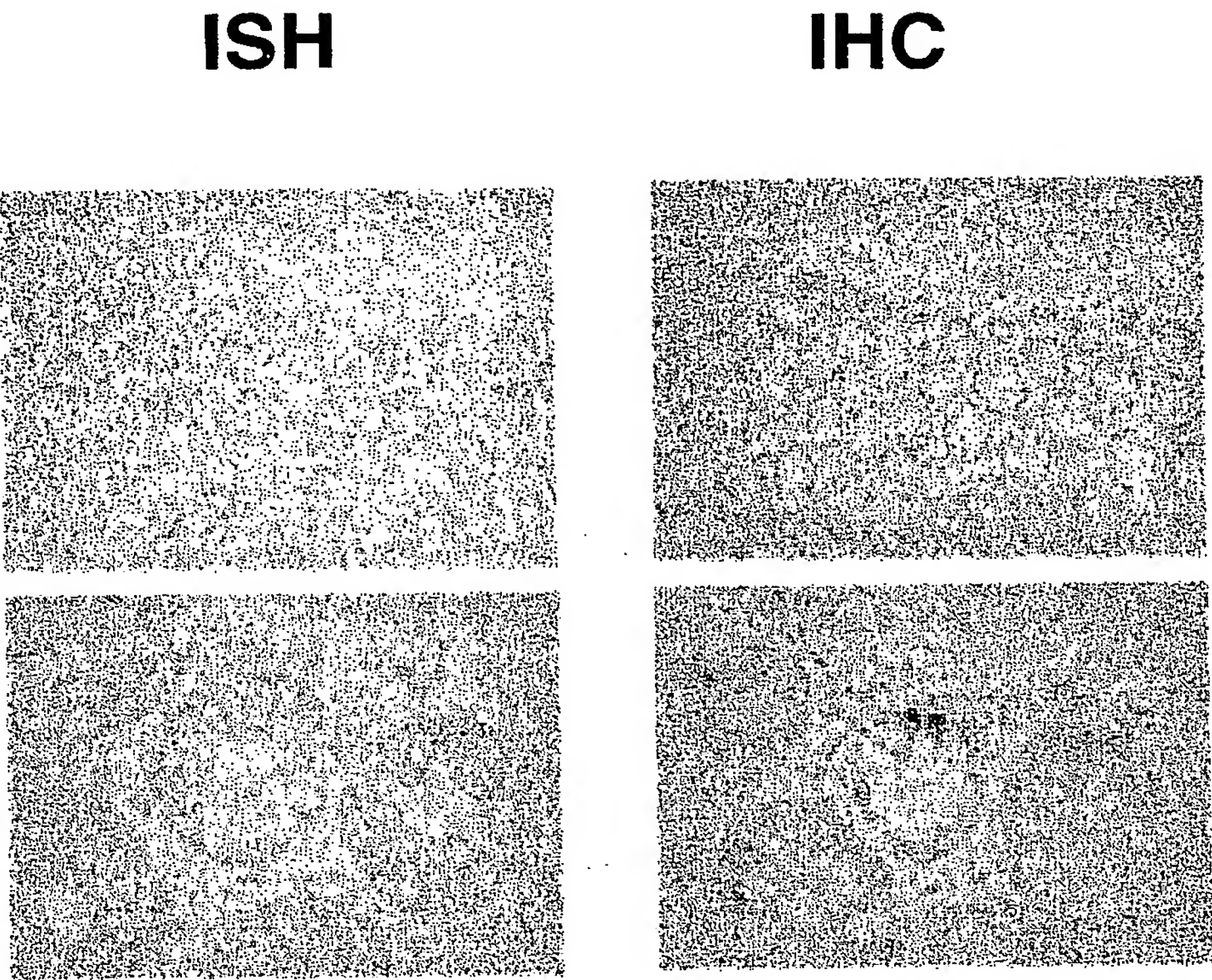


GT01  
(ISH)

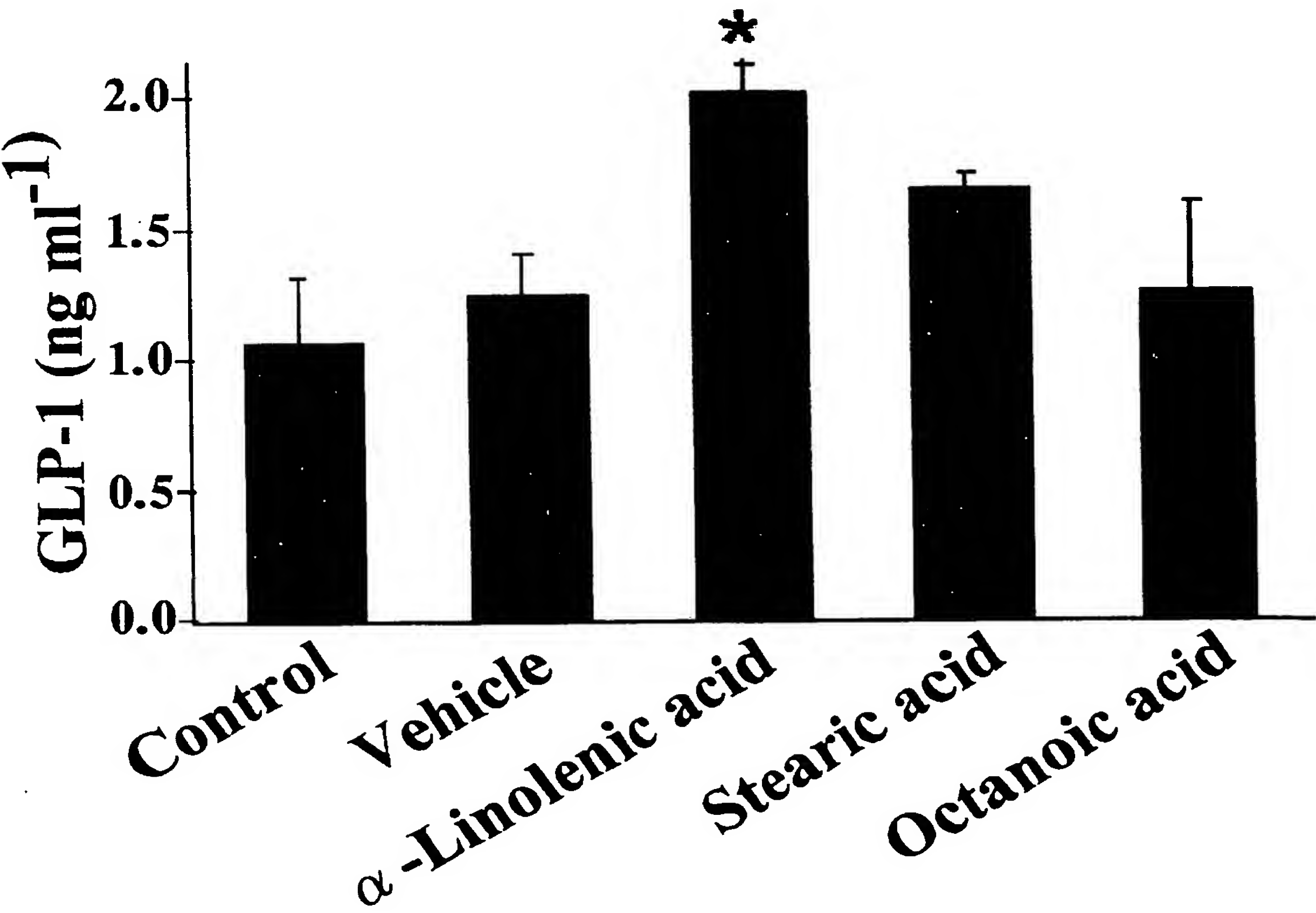




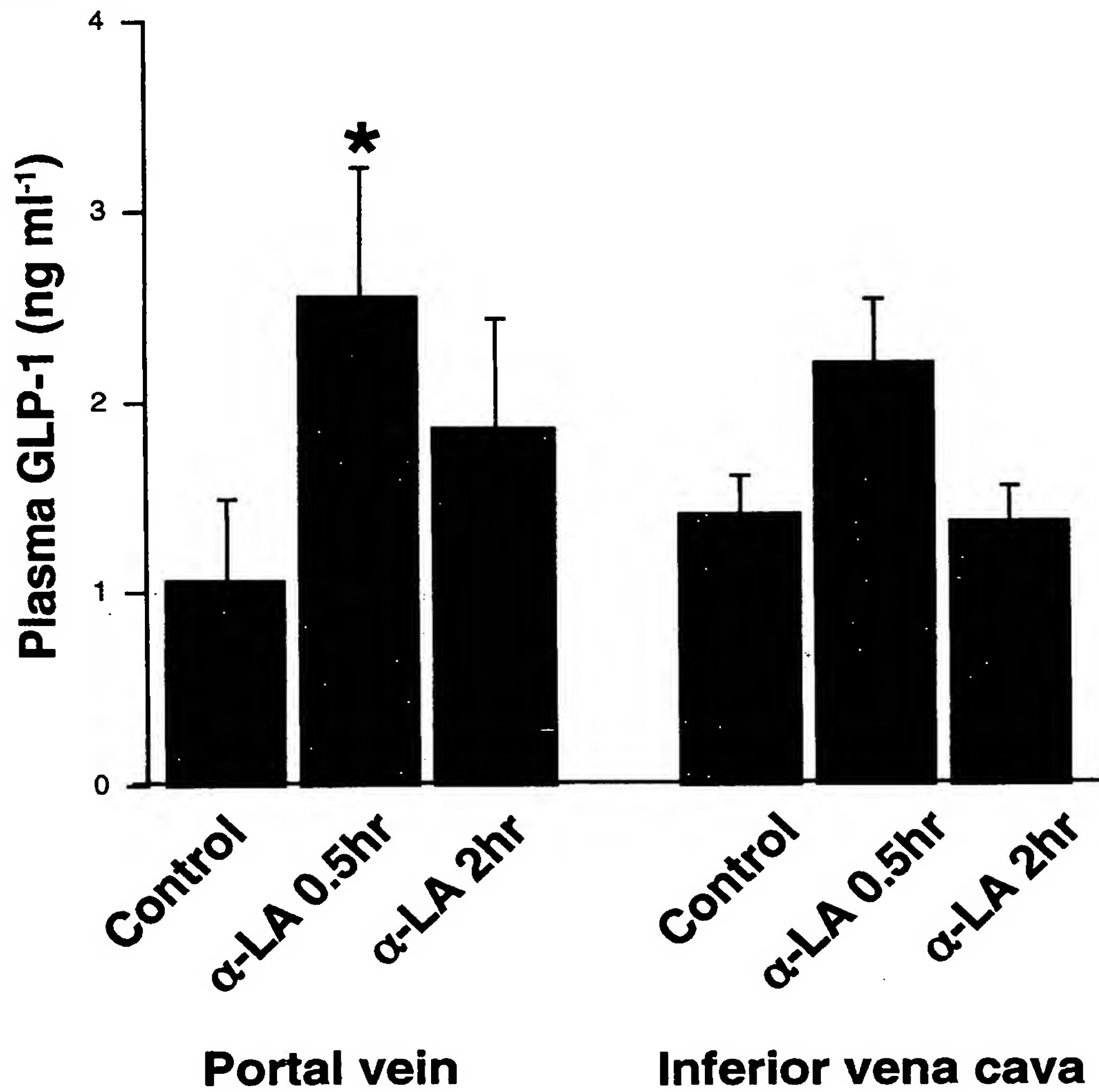
[図10]



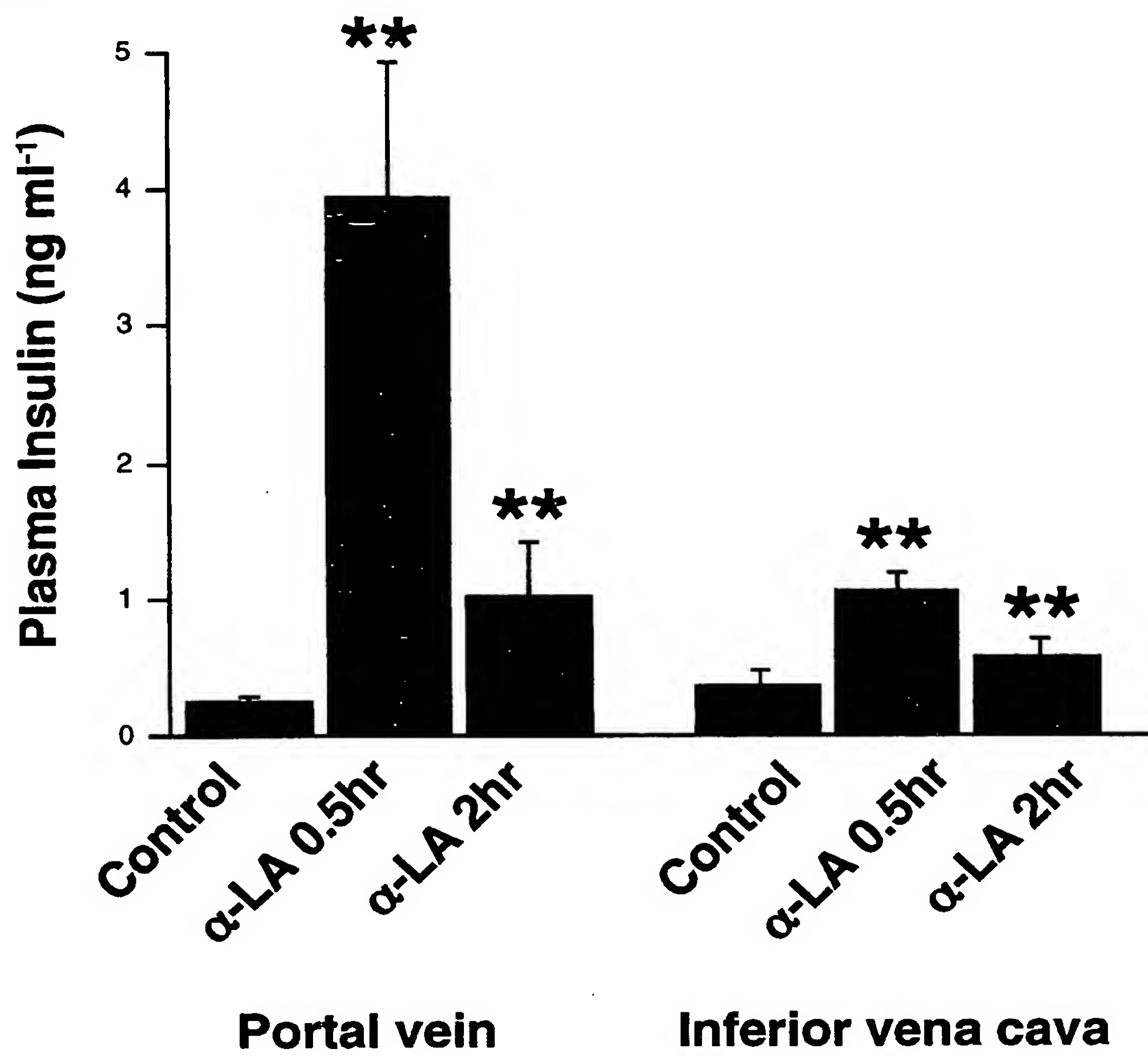
[図11]



[図12]



[図13]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012848

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, A61K31/19, A61K48/00, A61P3/10, C07K14/705,  
C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, A61K31/19, A61K48/00, A61P3/10, C07K14/705,  
C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, A61K38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Fredriksson R, et al., Seven evolutionarily conserved human rhodopsin, G protein-coupled receptors lacking close relatives. FEBS Lett. 20 November, 2003 (20.11.03), Vol.554, No.3, pages 381 to 388	1-7, 23-28/ 8-9, 17-22, 29, 41-46
X/A	WO 00/00611 A2 (MILLENNIUM PHARM INC.), 06 January, 2000 (06.01.00), Full text & AU 9947285 A & EP 1092024 A2 & US 6395877 B1 & JP 2002-522011 A & MX 2000-012953 A1	1-9, 17-19, 23-28, 41-43/ 20-22, 29, 41-46

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 November, 2004 (17.11.04)

Date of mailing of the international search report  
21 December, 2004 (21.12.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Examination No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012848

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 00/50596 A2 (MILLENNIUM PHARM INC.), 31 August, 2000 (31.08.00), Full text & AU 200036088 A & EP 1157109 A2 & US 6448005 B1 & JP 2002-536997 A	1-9, 17-29, 23-28, 41-43/ 20-22, 29, 41-46
X	WO 02/67868 A2 (MILLENNIUM PHARM INC.), 06 September, 2002 (06.09.02), Full text & US 2002/0177151 A1 & AU 2002258428 A1	1-9, 17-29, 41-46
X	Kagaku Dai Jiten Henshu Iinkai, Kagaku Dai Jiten 8, reduced-size edition (1962), page 552	11-14, 31-34
X	Seikagaku Jiten, 2nd edition (1990), pages 76, 161, 995, 1199, 202, 920	11-14, 31-34
X	Edited by Michinori OOKI et al., Kagaku Dai Jiten, 1st edition (1989), pages 2146, 458, 1474, 2435, 2303, 1805 to 1806, 1197, 92, 164 to 165, 2142, 238, 298 to 299, 2140, 374, 2473	11-14, 31-34
P,X	WO 2004/004000 A2 (PRIMAL INC.), 13 May, 2004 (13.05.04), Seq.ID No.89, Claims & AU 2003300776 A1	1-9, 17-29, 41-46
P,X	WO 2004/065960 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 05 August, 2004 (05.08.04), Full text (Family: none)	1-9, 11-14, 17-29, 31-34, 41-46
A	WO 03/68959 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 21 August, 2003 (21.08.03), Full text & AU 2003211952 A1 & JP 2004275001 A	1-9, 11-14, 17-29, 31-34, 41-46
A	HOLZ, GG. et al., Glucagon-like peptide-1 synthetic analogs: new therapeutic agents for use in the treatment of diabetes mellitus. Curr Med Chem. (2003) Vol.10, No.22, pages 2471 to 2483	1-9, 11-14, 17-29, 31-34, 41-46

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/012848

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 10, 15-16, 30 and 35-40  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
As with respect to "ligand of polypeptide claimed in any one of claims 1 to 5 or base of the polypeptide" recited in claim 10 and to "ligand of polypeptide claimed in any one of claims 23 to 26 or base of the polypeptide" recited in claim 30, (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/012848

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

what scope of compounds are covered thereby is unclear even if the contents of the description are taken into account, international search cannot be conducted on these claims.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/09, A61K 31/19, A61K 48/00, A61P 3/10, C07K 14/705, C12Q 1/02, G01N 33/15, G01N 33/50, A61K 38/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/09, A61K 31/19, A61K 48/00, A61P 3/10, C07K 14/705, C12Q 1/02, G01N 33/15, G01N 33/50, A61K 38/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Fredriksson R, et al., Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. FEBS Lett. (2003. 11. 20) Vol. 554, No. 3, p. 381-388	1-7, 23-28/ 8-9, 17-22, 2 9, 41-46
X/A	WO 00/00611 A2 (MILLENNIUM PHARM INC) 2000. 01. 06, 全文 & AU 9947285 A & EP 1092024 A2 & US 6395877 B1 & JP 2002-522011 A & MX 2000-012953 A1	1-9, 17-19, 23 -28, 41-43/20 -22, 29, 41-46

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 11. 2004

国際調査報告の発送日

21.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

左海 匡子

4 N

3 0 3 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 00/50596 A2(MILLENNIUM PHARM INC)2000.08.31, 全文 & AU 200036088 A & EP 1157109 A2 & US 6448005 B1 & JP 2002-536997 A	1-9, 17-19, 23 -28, 41-43/20 -22, 29, 41-46
X	WO 02/67868 A2(MILLENNIUM PHARM INC)2002.09.06, 全文 & US 2002/0177151 A1 & AU 2002258428 A1	1-9, 17-29, 41 -46
X	化学大辞典編集委員会, 化学大辞典8 縮刷版 (1962) 第552頁	11-14, 31-34
X	生化学辞典第2版 (1990) 第76頁, 第161頁, 第995頁, 第1199頁, 第202頁, 第920頁	11-14, 31-34
X	大木道則ら編, 化学大辞典第1版 (1989) 第2146頁, 第458頁, 第1474頁, 第2435頁, 第23 03頁, 第1805-1806頁, 第1197頁, 第92頁, 第1 64-165頁, 第2142頁, 第238頁, 第298-299 頁, 第2140頁, 第374頁, 第2473頁	11-14, 31-34
P, X	WO 2004/004000 A2(PRIMAL INC)2004.05.13, Seq. ID No.89, 特許請求の範囲 & AU 2003300776 A1	1-9, 17-29, 41 -46
P, X	WO 2004/065960 A1 (武田薬品工業) 2004.08.05, 全文 (ファミリーなし)	1-9, 11-14, 17 -29, 31-34, 41 -46
A	WO 03/68959 A1 (武田薬品工業) 2003.08.21, 全文 & AU 2003211952 A1 & JP 2004275001 A	1-9, 11-14, 17 -29, 31-34, 41 -46
A	HOLZ, GG. et al., Glucagon-like peptide-1 synthetic analogs: new therapeutic agents for use in the treatment of diabetes mellitus. Curr Med Chem. (2003) Vol.10, No.22, p.2471-2483	1-9, 11-14, 17 -29, 31-34, 41 -46

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 10, 15-16, 30, 35-40 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲10に記載の「請求項1乃至5のいずれか1項に記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩のリガンド」及び、請求の範囲30に記載の「請求項23乃至26のいずれか1項に記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩のリガンド」について、明細書の記載を参酌しても、どのような範囲の化合物が包含されるのか不明であるので、前記請求の範囲については、国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**